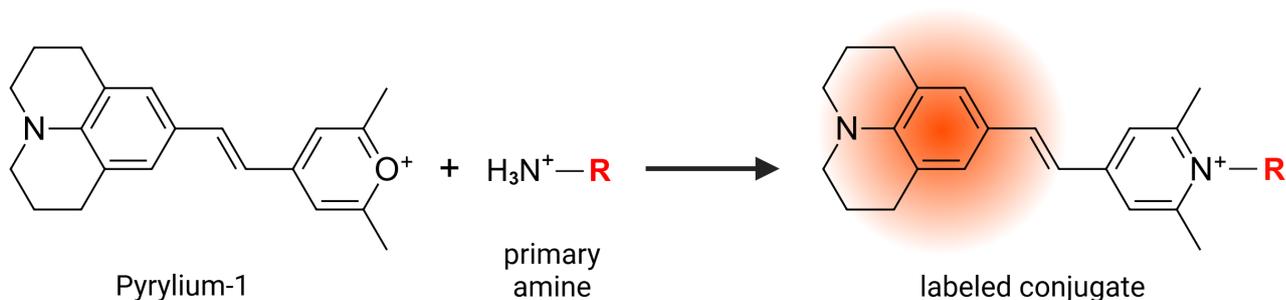


Мечение белков с помощью пирилиевых красителей

Пирилиевые красители — флуорогенные, реакционноспособные по отношению к первичным аминам красители, образующие флуоресцентные продукты после конъюгации с первичными аминогруппами пептидов, белков и других биомолекул.



В свободном состоянии пирилиевые красители практически не обладают флуоресценцией, однако, их квантовый выход возрастает в десятки раз после конъюгации с первичными аминами. Одновременно с этим наблюдается коротковолновый спектральный сдвиг флуоресценции красителя. Сдвиг спектров возбуждения/испускания и повышение квантового выхода после конъюгации способствуют значительному снижению фона от несвязанного красителя. Несвязанный краситель также гидролизует во время процедуры мечения. Все это позволяет метить молекулы, содержащие амины, с помощью простой одноэтапной инкубации при комнатной температуре без каких-либо дополнительных этапов очистки.

Меченные пирилиевыми красителями пептиды и белки готовы к использованию сразу после конъюгации. Поэтому они могут быть использованы в таких приложениях, как гель-электрофорез с SDS, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование и др. Пирилиевые красители также используют в качестве флуоресцентной метки в исследованиях связывания рецепторов.

Ниже приводится типовой протокол для мечения белков с помощью пирилиевых красителей.

Приготовление растворов

1. *Приготовление стокового раствора красителя*
 - a. Растворите 1 мг красителя в 100 мкл диметилформамида.
Важно! Не используйте в качестве растворителя аминоксодержащие растворы или буферы.
 - b. Стоковый раствор можно хранить в темноте при температуре 4 °С в течение 6 месяцев.
2. *Приготовление 0,1 М бикарбонатного буфера (pH 8,3)*
 - a. Растворите 4,2 г NaHCO_3 в 500 мл бидистиллированной воды.
 - b. Доведите буфер до pH 8,3 с помощью 1 N NaOH.
3. *Приготовление 22 mM фосфатного буфера (pH 7,2)*
 - a. Растворите 5,67 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,96 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л бидистиллированной воды.
 - b. Доведите буфер до pH 7,2 с помощью 1 N HCl.

Мечение белков

1. Растворите 2 мг белка в 0,5 мл бикарбонатного буфера (pH 8,3).
2. Добавьте по каплям 5–10 мкл рабочего раствора пирилия-1, -4 или -6 к раствору белка.
Добавьте по каплям 10–20 мкл рабочего раствора пирилия-8 к раствору белка.
3. Осторожно перемешивайте реакционную смесь при комнатной температуре в течение указанного времени:
 - 30 мин — для пирилия-1;
 - 1 ч — для пирилия-4 и -6;
 - 2 ч — для пирилия-8.*Важно!* Краситель проявляет высокую реакционную способность в диапазоне pH от 8,0 до 9,0.
4. При инкубации в основной среде реакционная смесь меняет цвет с синего (пирилий-1), фиолетового (пирилий-4) или пурпурного (пирилий-6) на желтый.
5. Несвязанный краситель гидролизуеться во время процедуры мечения, поэтому меченные пирилиевыми красителями пептиды и белки готовы к использованию сразу после конъюгации.

Очистка конъюгированного белка

Для некоторых применений может потребоваться очистка конъюгированного с красителем белка.

Меченый белок очищается с помощью гель-хроматографии с использованием Sephadex G25 в качестве неподвижной фазы и 22 mM фосфатного буфера (pH 7,2) в качестве элюента. Красная полоса указывает на меченый белок.