Мечение малеимидами белков и других тиолированных биомолекул

Реакция тиолов с малеимидами широко используется для биоконъюгации и мечения различных биомолекул, включая белки и пептиды. Реакция протекает по следующей схеме:



Малеимиды представляют собой электрофильные соединения, обладающие высокой селективностью по отношению к тиолам. Хотя малеимиды почти никогда не встречаются в природе, тиолы в ней очень распространены. В частности, они содержатся в белках и пептидах в виде остатков цистеина. Природная ДНК не содержит тиолов, однако, синтетические олигонуклеотиды с тиоловыми группами можно легко получить в лабораторных условиях.

Тиолы склонны к окислительной димеризации с образованием дисульфидных связей. Таким образом, остатки цистеина образуют дисульфидные мостики, которые стабилизируют третичные структуры белка. Дисульфиды, в отличие от тиолов, не способны реагировать с малеимидами, поэтому перед началом конъюгации необходимо восстановить дисульфиды и исключить кислород из реакции.

Протокол конъюгации зависит от растворимости исходных компонентов. Для соединений с низкой растворимостью в воде, например, большинства малеимидов флуоресцентных красителей, используют органические сорастворители, такие как ДМСО или ДМФА

Мы рекомендуем следующий протокол для конъюгации малеимидов красителей Lumiprobe с белками, пептидами и другими тиолированными биомолекулами.

1. Растворите белок или другую молекулу, содержащую тиол и подлежащую мечению, в пластиковом флаконе с дегазированным буфером, pH 7–7,5 (подходят PBS, Tris, HEPES, либо другие буферы, не содержащие тиолы). Буфер можно дегазировать, применяя к нему вакуум в течение нескольких минут или барботируя инертный газ (азот, аргон или гелий) через него. Для белков обычно используют концентрации от 1 до 10 мг/мл.
2. Добавьте во флакон избыток TCEP (трис-карбоксиэтилфосфина) для восстановления дисульфидных связей, продуйте смесь инертным газом и закройте флакон. Рекомендуется использовать 100-кратный молярный избыток TCEP. Инкубируйте смесь 20 мин при комнатной температуре.
3. Растворите малеимид красителя в ДМСО или свежем ДМФА (1–10 мг в 100 мкл).
4. Добавьте раствор малеимида красителя в раствор тиола (20-кратный избыток красителя), продуйте флакон инертным газом и плотно закройте.
5. Тщательно перемешайте содержимое флакона и оставьте его на ночь при +4°C или при комнатной температуре.
6. Очистите меченный продукт гель-фильтрацией, ВЭЖХ, ЖХБР или электрофорезом.

Для малеимидов с плохой растворимостью в воде, как и для большинства малеимидов красителей, мы рекомендуем использовать сорастворитель (ДМФА или ДМСО). Малеимиды с хорошей растворимостью в воде (например, sulfo-Cyanine-малеимиды) можно растворять непосредственно в воде. В случае выпадения осадка необходимо увеличить содержание органического сорастворителя в смеси, чтобы обеспечить лучший результат мечения.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Диализ рекомендуется в качестве средства очистки только для малеимидов с хорошей растворимостью в воде.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com