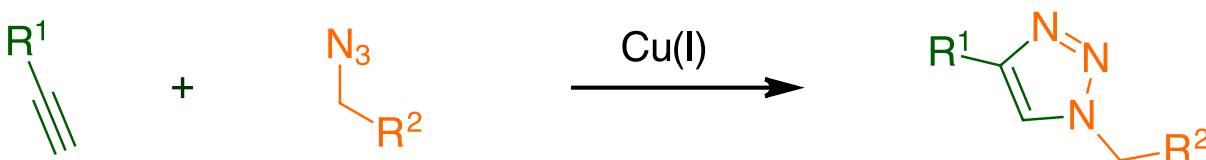


Протокол конъюгации белков, модифицированных алкином или азидом с азидами или алкинами красителей

Каталитический буфер для мечения белков предназначен для проведения реакции CuAAC с белками и оптимизирован для предотвращения повреждения биомолекул активными формами кислорода. Для реакции подходят белки, содержащие алкиновую или азидную группы, а также клетки или компоненты клеточных лизатов, метаболически меченые азидогруппами.

Реакция конъюгации происходит между азидом и терминальной группой алкина и приводит к образованию пятичленного гетероцикла — 1,2,3-триазола. Поскольку обе группы (азиды и алкины) практически не встречаются в природных биомолекулах, реакция является высокоспецифичной и эффективной для решения широкого спектра задач.



Реакция протекает в присутствии соединений меди (I); она почти не зависит от pH. Каталитический буфер специально оптимизирован для работы с белками и содержит соль меди (II) — стабильный предшественник каталитически активных соединений меди (I), ацетат триэтиламмония pH 6.8, водорастворимый лиганд ТНРТА и амингуанидин. Для восстановления меди (II) рекомендуется использовать свежеприготовленный раствор [аскорбиновой кислоты](#). ТНРТА лиганд в составе буфера ускоряет реакцию и стабилизирует каталитически активные соединения меди (I). Кроме того, присутствие водорастворимого ТНРТА лиганда позволяет проводить реакцию мечения белков в водной среде (без добавления органических растворителей) и, за счёт стабилизации степени окисления (I) меди, минимизирует генерацию активных форм кислорода (АФК) и нежелательное повреждения ими белков путем окисления гистидина, метионина и цистеина. Входящий в состав буфера амингуанидин препятствует связыванию реакционноспособных альдегидов — продуктов гидролиза дегидроаскорбата, с боковыми цепями аргинина, N-концевого цистеина и лизина.

Для проведения реакции понадобятся: модифицированный алкином или азидом белок в буфере без азиды натрия, [азидное](#) или [алкиновое](#) производное красителя, 1.5x [каталитический буфер](#), [аскорбиновая кислота](#). Шаги 6–9 рекомендуется выполнять в атмосфере инертного газа — азота или аргона.

Протокол

Мы рекомендуем следующий протокол для реакции конъюгации модифицированных белков с производными красителей:

1. Определите общий объем реакции исходя из используемого количества модифицированного белка:

! Объем раствора белка, модифицированного алкином или азидом, должен составлять не более 1/3 общего объема реакции.

Общий объем реакции, мкл	Количество белка
100	от 4 до 20 нмоль
200	от 20 до 40 нмоль
400	от 40 до 80 нмоль
600	от 80 до 600 нмоль

2. Рассчитайте объемы реагентов для реакции мечения, используя следующую таблицу:

Реагент	Объем, мкл	Концентрация стокового раствора
Азид или алкин красителя	(количество белка [нмоль]) × 0.3*	10 мМ в ДМСО или воде
Каталитический буфер для мечения белков	(общий объем реакции [мкл]) × 0.67	1.5x
Активатор (аскорбиновая кислота)	(общий объем реакции [мкл]) × 0.02	50 мМ в воде
Вода	(общий объем реакции [мкл]) - объем раствора красителя [мкл] - объем каталитического буфера [мкл] - объем раствора активатора [мкл]	—

* - избыток красителя может варьироваться в зависимости от количества азидных или алкиновых групп на молекуле белка. Расчет в таблице приведен для избытка красителя 3x. Для избытка красителя 1.5–10x необходимо умножить количество белка (нмоль) на 0.15–1. Однако помните, что если используется нерастворимый в воде азид или алкин, большой его избыток может выпасть в осадок из реакционной смеси. Пользуйтесь водорастворимыми красителями, например сульфированными цианиновыми красителями [sulfo-Cyanine](#).

3. Приготовьте стоковый раствор *азиды или алкина красителя* (10 мМ в ДМСО или воде, для водорастворимых алкинов и азидов) и *активатора* (аскорбиновой кислоты, 50 мМ в воде).

Обратите внимание, аскорбиновая кислота легко окисляется на воздухе. Используйте только свежеприготовленный раствор активатора (раствор стабилен в течение суток). Для приготовления стокового раствора растворите 10 мг [аскорбиновой кислоты](#) в 1.1 мл воды.

4. Добавьте *каталитический буфер для мечения белков* к раствору модифицированного белка и размешайте на вортексе.
5. Добавьте рассчитанный объем стокового раствора *азиды или алкина красителя* и еще раз хорошо размешайте

на вортексе.

6. *(рекомендуется)* Дегазируйте смесь для удаления кислорода. Для этого присоедините одноразовый наконечник от автоматической пипетки к пластиковой или силиконовой трубке, подсоединенной к редуктору баллона с инертным газом (аргоном, азотом). Включите очень слабый поток газа и опустите наконечник в пробирку так, чтобы он находился на 3–10 мм выше уровня жидкости и не касался жидкости и стенок пробирки. Поток газа должен быть таким, чтобы образовывать воронку в жидкости, но не вызывать ее разбрызгивания. Удерживайте наконечник в таком положении в течение 10–20 с.

Если параллельно происходит постановка нескольких реакций меченая, для дегазирования можно использовать центрифужный концентратор. Для этого установите пробирки в прибор, включите вращение, затем на 30–40 с включите вакуум и сбросьте его, подавая на вход прибора инертный газ.

7. Добавьте раствор *активатора (аскорбиновой кислоты)*, затем в течение нескольких секунд продуйте пробирку инертным газом и закройте ее.
8. Размешайте раствор на вортексе.
9. Выдержите смесь при комнатной температуре в течение 8–16 часов.
10. Для выделения конъюгата белка с красителем используйте диализ или гель-фильтрацию.

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
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