

Мечение биомолекул активированными эфирами

Активированные эфиры, такие как NHS- (N-гидроксисукцинимидные), а также другие (sulfo-NHS, STP-), являются реакционноспособными производными, способными модифицировать аминогруппы биомолекул. Наиболее часто используются NHS-эфиры.

С помощью активированных эфиров часто вводят репортерные группы, такие как флуоресцентные красители. Алкины и азидогруппы могут быть также введены в состав биомолекул с помощью соответствующих активированных эфиров для того, чтобы подготовить биомолекулы к модификации через Click Chemistry.

Поскольку почти все белки и пептиды содержат аминогруппы, их модификация особенно часто проводится этим посредством активированных эфиров. Другие биомолекулы, которые могут быть помечены - аминокислоты, олигонуклеотиды с аминолинком, и аминокислоты-содержащие сахара.

Реакция активированных эфиров с аминами проявляет существенную зависимость от pH. При низких значениях pH происходит протонирование аминогрупп, в результате чего снижается эффективность реакции. При высоких значениях pH существенным становится процесс гидролиза активированного эфира. Оптимальным значением pH для модификации является 8.3-8.5.

Обычно в качестве растворителя для модификации биополимеров используют воду. Поскольку многие активированные эфиры имеют низкую растворимость в воде, в качестве со-растворителя применяют диметилсульфоксид (ДМСО) или диметилформамид (ДМФ). Раствор активированного эфира в органическом растворителе прибавляют к раствору биополимера в буфере, обеспечивающем оптимальное значение pH. Диметилформамид может портиться при хранении, при этом в нем накапливается диметиламин, способный реагировать с активированными эфирами. Поэтому ДМФ для мечения должен быть хорошего качества (при этом он не имеет запаха диметиламина).

Мы рекомендуем следующий общий протокол для мечения активированными эфирами.

1. Рассчитайте количество активированного эфира:

$$\text{Масса Активированного Эфира [мг]} = 8 \times \text{Масса Амина [мг]} \times \frac{\text{Молекулярная Масса Активированного Эфира [Да]}{\text{Молекулярная Масса Амина [Да]}}$$

Число 8 - избыток активированного эфира. Это экспериментальное значение для достижения моно-мечения, обычное для водорастворимых белков и пептидов. Во многих случаях, однако, это значение необходимо оптимизировать, так как оно зависит от структуры и растворимости белка и активированного эфира. Молекулярные массы активированных эфиров Lumiprobe могут быть найдены на страницах соответствующих продуктов.

Например, чтобы пометить 3 мг BSA (молекулярная масса 69300 Да) активированным эфиром Су5 NHS (молекулярная масса 592 Да), и получить в среднем мономеченный продукт, необходимо взять $8 \times 3 \text{ мг} \times 592 \text{ Да} / 69300 \text{ Да} = 0.21 \text{ мг}$ активированного эфира Су5 NHS.

2. Определите объем реакционной смеси. Реакцию можно проводить на любой шкале от наномолей до десятков граммов. При мечении минимальных количеств используйте минимальный объем реакции (10-20 мкл). Оптимальная концентрация белка для мечения составляет 1-10 мг на мл смеси и более.

3. Растворите активированный эфир в чистом ДМФ или ДМСО (1/10 объема реакционной смеси). Для водорастворимых активированных эфиров можно использовать воду (водный раствор необходимо использовать и нельзя хранить). Растворы в безводном ДМФ можно на протяжении 1-2 месяцев при -20°C.

4. Растворите амин (белок, аминок-ДНК и т.д.) в буфере рН 8.3-8.5 (объем - 9/10 реакционной смеси). Можно использовать 0.1 М раствор бикарбоната натрия (NaHCO_3). Альтернативные буферы - 0.1 М Трис (хотя Трис содержит аминогруппу, она является малореакционноспособной в отношении активированных эфиров), или 0.1 М фосфатный буфер с рН 8.3-8.5. Значение рН буфера наиболее важно для успеха реакции.

При мечении значительных количеств веществ (когда количество активированного эфира составляет сотни миллиграмм) следует учитывать тенденцию к закислению смеси при гидролизе активированного эфира. Необходимо использовать более концентрированный буфер и следить за значением рН.

5. Добавьте раствор активированного эфира к раствору амина в буфере и хорошо размешайте на вортексе. Инкубируйте на льду в течение ночи, или при комнатной температуре в течение по меньшей мере 4 часов.

6. Очистите конъюгаты с помощью подходящего метода. Для макромолекул наиболее подходит гель-фильтрация. Можно использовать переосаждение или хроматографию. Органические примеси (такие как N-гидроксисукцинимид, активированный эфир и соответствующая кислота, образующаяся при гидролизе), как правило, хорошо отделяются от продукта. Для белков и нуклеиновых кислот можно использовать осаждение этанолом или ацетоном.