

NHS-Estermarkierung von Biomolekülen, die primäre Aminogruppen enthalten

NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimidester) und andere aktivierte Ester (Sulfo-NHS, Sulphotetrafluorophenyl — STP) sind reaktionsfähige Verbindungen, die für die Modifizierung von Aminogruppen geeignet sind. NHS-Ester sind die am weitesten verbreitete Art von aktivierten Estern.

Übliche Modifizierungen sind Fluoreszenzfarbstoffe, Fluoreszenzlöcher (Quencher) und andere Reportergruppen. Alkylgruppen und Azidogruppen können unter Verwendung aktivierter Ester angefügt werden, um Biomoleküle für die Click-Chemie nutzbar zu machen.

Besonders häufig sind Modifikationen von Proteinen und Peptiden, da diese fast immer Aminogruppen enthalten. Weitere Beispiele sind Modifikationen von Amino-Oligonukleotiden, Amino-modifizierter DNA und Amino-haltigen Zuckern.

Die Reaktion von NHS-Estern mit Aminogruppen ist stark pH-abhängig: Bei niedrigem pH-Wert wird die Aminogruppe protoniert und es findet keine Modifikation statt. Bei einem über dem optimalen pH-Wert erfolgt die Hydrolyse des NHS-Esters schnell und die Ausbeute an modifiziertem Molekül nimmt ab. Der optimale pH-Wert für die Modifikation liegt bei 8,3-8,5.

Wasser ist das am häufigsten verwendete Lösungsmittel zum Auflösen von NHS-Estern für die Markierung von Biomolekülen. Wenn NHS-Ester in wässrigen Lösungen schlecht löslich ist, kann er zunächst in [Dimethylsulfoxid \(DMSO\)](#) oder Dimethylformamid (DMF) gelöst und dann zu einer Proteinlösung in einem Puffer mit pH 8,3–8,5 gegeben werden. Beachten Sie, dass DMF zu Dimethylamin zerfallen kann, das fischig riecht und mit aktivierten Estern reagieren kann. Daher ist es für die Kennzeichnung von Biomolekülen wichtig, [hochwertiges DMF](#) zu verwenden, das kein Dimethylamin enthält und keinen Fischgeruch hat.

Wir empfehlen folgendes Protokoll für die Markierung von Biomolekülen mit von Lumiprobe hergestellten **NHS-Estern**:

1. Berechnen Sie die erforderliche Menge an NHS-Ester mithilfe der folgenden Formel oder unserem [Proteinmarkierungsrechner](#):

$$\text{NHS_Ester_Gewicht [mg]} = 8 \times \text{Amino_Verbindung_Gewicht [mg]} \times \text{NHS_Ester_Molekülmasse} / \text{Amino_Verbindung_Molekülmasse}$$

8 ist ein molarer Überschuss an NHS-Ester. Es handelt sich um einen empirischen Wert für die Monomarkierung, der für viele gängige Proteine und Peptide geeignet ist. In einigen Fällen kann jedoch die Verwendung von weniger oder mehr NHS-Ester die Ausbeute an modifizierten Biomolekülen erhöhen. Dies hängt von der Proteinstruktur, dem zur Markierung verwendeten Reagenz und seiner Löslichkeit ab. Das Molgewicht der Lumiprobe-Produkte finden Sie auf den entsprechenden Produktseiten.

Um zum Beispiel 3 mg BSA (Molekülmasse 66.500) mit einem Cyanin5 NHS-Ester (Molekülmasse 616) zu markieren und die maximale Ausbeute an einfach markiertem Produkt zu erhalten, muss man $8 \times 3 \text{ mg} \times 616 / 66.500 = 0,22 \text{ mg}$ des Cyanin5 NHS-Esters einsetzen.

2. Berechnen Sie das Volumen der Reaktionsmischung. Die optimale Konzentration des Biomoleküls in der Markierungsreaktion beträgt 1–10 mg pro ml. Die Markierung kann in jedem Maßstab von Nanomol bis zu mehreren

Dutzend Gramm durchgeführt werden. Wenn Sie eine geringe Menge an Biomolekülen kennzeichnen, halten Sie das Volumen der Reaktionsmischung auf einem Minimum (10–20 µL).

3. NHS-Ester in 1/10 Reaktionsvolumen Wasser, DMF oder DMSO auflösen. Dimethylaminfreies DMF oder Wasser sind bevorzugte Lösungsmittel. In DMF gelöster NHS-Ester kann in Lösung 1–2 Monate bei -20 °C gelagert werden. Eine wässrige Lösung des NHS-Esters sollte unmittelbar nach der Zubereitung verwendet werden.
4. Biomolekül in 9/10 Reaktionsvolumen Puffer mit pH 8,3–8,5 auflösen.
0,1 M Natriumbicarbonatlösung hat einen geeigneten pH-Wert. Eine weitere Alternative ist 0,1 M Phosphatpuffer. Beachten Sie, dass der pH-Wert der wichtigste Faktor für die erfolgreiche Markierung von Biomolekülen mit NHS-Ester ist. Vermeiden Sie die Verwendung von Puffern, die Amine enthalten (Tris-basierte Puffer können manchmal verwendet werden, werden aber nicht empfohlen. Tris enthält Aminogruppen, aber seine Affinität zu aktivierten Estern ist gering). Beachten Sie bei der Etikettierung im großen Maßstab (mit Hunderten von Milligramm NHS-Ester), dass die Mischung aufgrund der Hydrolyse des NHS-Esters mit der Zeit dazu neigt, anzusäuern. Überwachen Sie den pH-Wert oder verwenden Sie dann einen konzentrierteren Puffer.
5. NHS-Esterlösung zur Lösung des Biomoleküls hinzufügen und gut vortexen. Über Nacht auf Eis oder mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahren.
6. Reinigen Sie das Konjugat mit einer geeigneten Methode: Die Gelfiltration für Makromoleküle ist die gebräuchlichste Methode. Eine weitere Alternative ist die Chromatographie. Für Proteine und Nukleinsäuren kann eine Ethanol- oder Acetonfällung eingesetzt werden. Organische Verunreinigungen (wie N-Hydroxysuccinimid, NHS-Ester, durch Hydrolyse entstandene Säure) lassen sich mit diesen Methoden fast immer leicht abtrennen.

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