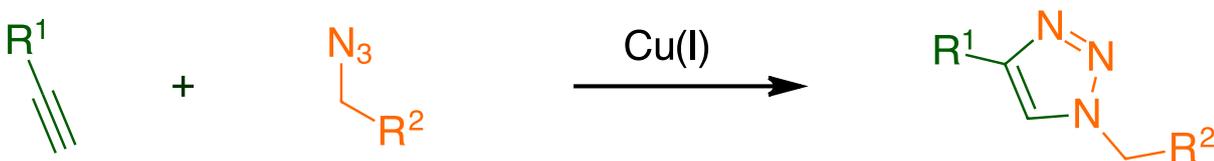


Protokoll: Konjugationsreaktion von alkin- bzw. azidmodifizierten Proteinen mit Farbstoff-Aziden bzw. -Alkinen

Der Puffer für die Proteinmarkierung wird bei der CuAAC-Reaktion mit Proteinen eingesetzt und ist dafür optimiert, Biomoleküle vor Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies zu schützen. Für die Reaktion eignen sich alkin- bzw. azidmodifizierte Proteine sowie mit Azidgruppen metabolisch markierte Zellen oder Zellysate.

Bei der Konjugationsreaktion eines Azids mit der terminalen Alkingruppe wird ein 5-gliedriger Heterozyklus — 1,2,3-Triazol gebildet. Da Azid- und Alkingruppen in natürlichen Biomolekülen praktisch nie vorkommen, ist die Reaktion sehr spezifisch und breit anwendbar.



Die Reaktion verläuft in Anwesenheit von Kupfer(I)-Verbindungen und ist kaum vom pH-Wert abhängig. Der Puffer für die Proteinmarkierung ist für die Arbeit mit Proteinen optimiert und enthält ein Kupfer(II)-Salz, einen stabilen Vorgänger katalytisch aktiver Kupfer(I)-Verbindungen, Triethylammoniumacetat pH 6.8, den wasserlöslichen Liganden THPTA und Aminoguanidin. Es wird empfohlen, Kupfer(II) mit einer frisch angesetzten [Ascorbinsäure](#)-Lösung zu reduzieren. Der Ligand THPTA im Puffer beschleunigt die Reaktion und stabilisiert katalytisch aktive Kupfer(I)-Verbindungen. Die Anwesenheit des wasserlöslichen THPTA erlaubt darüber hinaus die Durchführung der Reaktion im wässrigen Medium (ohne Zusatz organischer Hilfslösungsmittel). Durch die Stabilisierung von Kupfer(I)-Verbindungen minimiert THPTA die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und somit eine unerwünschte Schädigung der Proteine durch Oxidation von Histidin, Methionin und Cystein. Zusätzlich zugesetztes Aminoguanidin soll die Bindung reaktionsfähiger Aldehyde, die aus Dehydroascorbat durch Hydrolyse entstehen können, an die Seitenketten von Arginin, N-terminalem Cystein und Lysin verhindern.

Für die Reaktion werden ein in azidfreiem Puffer gelöstes alkin- bzw. azidmodifiziertes Protein, [Farbstoff-Azid](#) bzw. [-Alkin](#), 1.5x [Puffer für die Proteinmarkierung](#), [Ascorbinsäure](#) benötigt. Es wird empfohlen, Schritte 6-9 unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchzuführen.

Protokoll

Wir empfehlen folgendes Protokoll für die Konjugation von modifizierten Proteinen mit Farbstoffderivaten:

1. Berechnen Sie das Gesamtreaktionsvolumen abhängig von der Menge des modifizierten Proteins:

! Das Volumen der alkin- bzw. azidmodifizierten Proteinlösung darf maximal 1/3 des Gesamtreaktionsvolumens betragen.

Gesamtreaktionsvolumen, μl	Proteinmenge
100	von 4 bis 20 nmol
200	von 20 bis 40 nmol
400	von 40 bis 80 nmol
600	von 80 bis 600 nmol

2. Berechnen Sie die Volumina der für die Proteinmarkierung benötigten Reagenzien anhand der untenstehenden Tabelle:

Reagenz	Volumen, μl	Konzentration der Stammlösung
Farbstoff-Azid oder -Alkin	$(\text{Proteinmenge [nmol]}) \times 0.3^*$	10 mM in DMSO oder Wasser
Puffer für die Proteinmarkierung	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}]) \times 0.67$	1.5x
Ascorbinsäure	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}]) \times 0.02$	50 mM in Wasser
Wasser	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}]) - \text{Volumen der Farbstofflösung } [\mu\text{l}] - \text{Puffervolumen } [\mu\text{l}] - \text{Volumen der Ascorbinsäurelösung } [\mu\text{l}]$	—

** - der Farbstoffüberschuss kann in Abhängigkeit von der Anzahl der Azid- bzw. Alkingruppen in Proteinmolekülen variieren. Die Berechnungen in der Tabelle beziehen sich auf den 3-fachen Farbstoffüberschuss. Für den 1.5–10-fachen Farbstoffüberschuss soll die Proteinmenge (nmol) mit 0.15–1 multipliziert werden. Beachten Sie jedoch bitte, dass bei Verwendung von Aziden bzw. Alkinen mit geringer Wasserlöslichkeit diese bei einem erheblichen Überschuss aus dem Reaktionsgemisch ausfallen können. Verwenden Sie daher wasserlösliche Farbstoffe wie sulfonierte Cyaninfarbstoffe [sulfo-Cyanine](#).*

3. Bereiten Sie die Stammlösung des *Farbstoff-Azids bzw. -Alkins* (10 mM in DMSO oder Wasser für wasserlösliche Alkine und Azide) und *Ascorbinsäure* (50 mM in Wasser) zu.

Beachten Sie bitte, dass Ascorbinsäure anfällig für Oxidation durch Luftsauerstoff ist. Verwenden Sie daher immer nur frisch angesetzte Lösungen (die Lösung ist 24 Stunden lang stabil). Bereiten Sie die Stammlösung zu, indem Sie 10 mg [Ascorbinsäure](#) in 1,1 ml Wasser auflösen.

4. Fügen Sie den *Puffer für die Proteinmarkierung* zu der Lösung des modifizierten Proteins hinzu und vortexen Sie.
5. Fügen Sie die Stammlösung des *Farbstoff-Azids bzw. -Alkins* hinzu und vortexen Sie noch einmal gut.
6. (*Empfohlen*) Entgasen Sie die Lösung. Schließen Sie dafür eine Einmalpipettenspitze an den Plastik- bzw. Silikonschlauch des Druckreglers der Flasche mit Inertgas (Argon, Stickstoff) an. Stellen Sie einen sehr schwachen Gasstrom ein und

halten Sie die Pipettenspitze 3-10 mm oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Berühren Sie dabei weder Flüssigkeit noch Röhrenwände. Der Gasstrom muss so eingestellt sein, dass er einen Strudel in der Flüssigkeit erzeugt, das Verspritzen der Flüssigkeit ist jedoch zu vermeiden. Halten Sie die Pipettenspitze so 10–20 s lang.

Werden mehrere Markierungsreaktionen parallel vorbereitet, kann mit einem Zentrifugalkonzentrator entgast werden. Platzieren Sie die Röhren im Gerät, starten Sie den Durchlauf, bauen Sie für 30–40 s Vakuum auf und leiten Sie anschließend Inertgas durch das Gerät.

7. Fügen Sie die *Ascorbinsäure-Lösung* hinzu, leiten Sie einige Sekunden lang ein Inertgas durch das Röhren hindurch und verschließen Sie es.
8. Vortexen Sie die Lösung.
9. Inkubieren Sie das Gemisch bei Raumtemperatur für 8–16 Stunden.
10. Reinigen Sie das Reaktionsprodukt mittels Dialyse oder Gelfiltration.

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