

Protokoll: NHS-Ester-Markierung von Aminobiomolekülen

NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimidester) und andere aktivierte Ester (Sulfo-NHS, Sulfotetrafluorophenyl — 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, Fluoreszenzlöscher (Quencher) und andere Reportergruppen. Alkylgruppen und Azidogruppen können unter Verwendung aktivierter Ester angefügt werden, um Biomoleküle für die Click-Chemie nutzbar zu machen.

Da Aminogruppen praktisch immer in Proteinen und Peptiden vorliegen, ist die Modifizierung dieser Biopolymere besonders weit verbreitet. Andere Beispiele sind Amino-Oligonukleotide, aminomodifizierte DNA und aminhaltige Zucker.

Die Reaktion von NHS-Estern mit Aminen ist stark pH-abhängig: Bei einem niedrigen pH-Wert ist die Aminogruppe protoniert, wodurch keine Modifizierung stattfinden kann. Bei einem höheren als dem optimalen pH-Wert kommt es zur schnellen Hydrolyse des NHS-Esters, sodass die Ausbeute der Modifizierung sinkt. Der optimale pH-Wert für die Modifizierung liegt bei 8,3–8,5.

Wasser ist das am weitesten verbreitete Lösungsmittel für die Markierung. Wenn der NHS-Ester schwer löslich ist, kann er in DMSO bzw. DMF aufgelöst und zu der wässrigen Proteinlösung (pH 8,3–8,5) zugegeben werden. Beachten Sie, dass das DMF keine Amine enthalten darf und somit geruchlos sein muss.

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

1. Berechnen Sie die benötigte Menge an NHS-Ester:

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

8 ist der Molüberschuss an NHS-Ester. Hierbei handelt es sich um einen experimentellen Wert für die Monomarkierung, der für zahlreiche verbreitete Proteine und Peptide geeignet ist. In einigen Fällen ist es jedoch erforderlich, mehr oder weniger NHS-Ester zu verwenden. Dies ist abhängig von der Proteinstruktur, dem Reagenz und der Löslichkeit. Die Molekülmasse von Erzeugnissen von Lumiprobe ist auf den entsprechenden Produktseiten zu finden.

Um zum Beispiel 3 mg BSA (Molekülmasse 69.300) mit einem Cyanin 5 NHS-Ester (Molekülmasse 592) zu markieren und die maximale Ausbeute an einfach markiertem Produkt zu erhalten, muss man $8 \times 3 \text{ mg} \times 592 / 69.300 = 0,21 \text{ mg}$ des Cyanin 5 NHS-Esters einsetzen.

2. Bestimmen Sie das Volumen des Reaktionsgemisches. Die Markierung kann in einer beliebigen Größenordnung von Nanomolen bis Dutzenden Gramm erfolgen. Dabei sollte man ein Mindestvolumen von 10–20 µl nicht unterschreiten. Höhere Konzentrationen des Aminobiomoleküls (1-10 mg/ml Endkonzentration) sind optimal.
3. Lösen Sie den NHS-Ester in 1/10 des Reaktionsvolumens an DMF oder DMSO auf. Aminfreies DMF ist hierbei das bevorzugte Lösungsmittel. Nach der Reaktion kann der NHS-Ester in Lösung ein bis zwei Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.
4. Lösen Sie das Biomolekül in 9/10 des Reaktionsvolumens an Puffer mit einem pH-Wert von 8,3–8,5 auf.

0,1 M Natriumbicarbonatlösung hat einen geeigneten pH-Wert. Eine Alternative ist 0,1 M Phosphatpuffer. Beachten Sie, dass der pH-Wert von entscheidender Bedeutung ist. Vermeiden Sie die Verwendung von aminhaltigen Puffern (TRIS-Puffer kann manchmal eingesetzt werden, wird aber nicht empfohlen).

Bei Markierungen im großen Maßstab (Hunderte Milligramm von NHS-Ester) ist zu beachten, dass die Lösung aufgrund der Hydrolyse von NHS-Ester über die Zeit dazu tendiert anzusäuern. Kontrollieren Sie in diesem Fall den pH-Wert beziehungsweise verwenden sie einen konzentrierteren Puffer.

5. Geben Sie die NHS-Ester-Lösung zu der Biomolekül-Lösung hinzu und schütteln Sie gut. Inkubieren Sie das Reaktionsgemisch über Nacht auf Eis oder mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur.
6. Reinigen Sie das Konjugat unter Verwendung eines geeigneten Verfahrens: Gelfiltration wird für Makromoleküle am häufigsten angewandt. Alternativen sind Ausfällung und Chromatografie. Organische Verunreinigungen (wie zum Beispiel N-Hydroxysuccinimid, NHS-Ester, durch Hydrolyse hergestellte Säure) lassen sich fast immer problemlos abtrennen. Bei Proteinen und Nukleinsäuren können Ethanol- oder Acetonfällung angewandt werden.

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