

## Protokoll: Maleimid-Markierung von Proteinen und anderen thiolhaltigen Biomolekülen

Die Reaktion von Thiolen mit Maleimiden wird weitverbreitet für die Biokonjugation und Markierung von Biomolekülen (einschließlich Proteinen und Peptiden) genutzt. Sie läuft nach folgendem Schema ab:



Maleimide sind elektrophile Substanzen, die eine hohe Selektivität für Thiole aufweisen. Während Maleimide fast nirgends in der Natur vorkommen, sind Thiole weit verbreitet. In Proteinen und Peptiden findet man sie als Cysteinreste. Wenngleich natürliche DNA keine Thiolgruppen enthält, können synthetische Oligonukleotide mit Thiolgruppen einfach hergestellt werden.

Thiole sind anfällig für oxidative Dimerisierung in Form der Ausbildung von Disulfidbindungen. So bilden beispielsweise Cysteinreste Cystinbrücken aus, die die Tertiärstruktur von Proteinen stabilisieren. Solche Disulfide reagieren nicht mit Maleimiden. Daher ist es notwendig, Disulfidbrücken vor der Konjugation zu reduzieren und Sauerstoff aus der Reaktion auszuschließen.

Das Konjugationsprotokoll ist abhängig von der Löslichkeit der Ausgangskomponenten. Bei Reagenzien mit geringer Wasserlöslichkeit (wie z. B. den meisten Fluorophor-Maleimiden) ist der Einsatz eines organischen Hilfslösungsmittels, wie beispielsweise DMSO oder DMF, unverzichtbar.

Wir empfehlen folgendes Protokoll für die Konjugation von [Farbstoff-Maleimiden](#) von Lumiprobe mit Proteinen, Peptiden und anderen thiolhaltigen Biomolekülen:

1. Lösen Sie die zu markierende Substanz in entgastem Puffer bei pH 7–7,5 (PBS, TRIS, HEPES sind gut geeignet, wobei auch andere Puffer verwendet werden können, die keine Thiole enthalten) in einem Reaktionsgefäß. Der Puffer kann entgast werden, indem man für mehrere Minuten ein Vakuum anlegt oder Inertgas (Stickstoff, Argon oder Helium) hindurchperlen lässt. Eine geeignete Proteinkonzentration liegt im Bereich von 1–10 mg/ml.
2. Geben Sie einen 100-fachen molaren Überschuss an TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin) hinzu, um Disulfidbindungen zu reduzieren. Verdrängen Sie anschließend die Luft im Reaktionsgefäß durch Inertgas und schließen Sie es. Inkubieren Sie die Lösung 20 min lang bei Raumtemperatur.
3. Lösen Sie das Maleimid in DMSO oder in frischem [DMF](#) (1–10 mg in 100 µl).<sup>1</sup>
4. Geben Sie die Fluorophor-Lösung zur Thiol-Lösung (20-facher Überschuss an Fluorophor). Verdrängen Sie anschließend die Luft im Reaktionsgefäß durch Inertgas und schließen Sie es.
5. Mischen Sie sorgfältig und inkubieren Sie die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur oder 4 °C.
6. Reinigen Sie das Reaktionsprodukt mittels Gelfiltration, HPLC, FPLC oder Elektrophorese.<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Für Maleimide mit geringer Wasserlöslichkeit, was für die meisten Maleimide zutrifft, empfehlen wir die Verwendung eines Hilfslösungsmittels (DMF oder DMSO). Gut wasserlösliche Maleimide (wie Sulfo-Cyanin-Maleimide) können direkt in Wasser gelöst werden. Sollte ein Präzipitat entstehen, erhöhen Sie den Anteil des organischen Hilfslösungsmittels, um eine bessere Markierung zu erzielen.
- <sup>2</sup> Dialyse ist als Reinigungsmethode nur bei gut wasserlöslichen Maleimiden zu empfehlen.