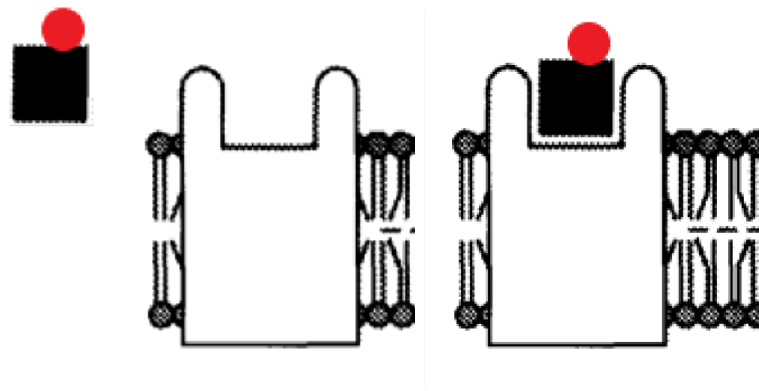


Синтез нейротоксинов с метками FITC, AF488 и Cy5

1996-racer@mail.ru

Благодаря способности определенных нейротоксинов специфически связываться с конкретными клеточными рецепторами, их флуоресцентно-меченные токсины могут быть крайне полезны для визуализации рецепторов методами флуоресцентной микроскопии.



Целью данного этапа работы являлось получение в достаточном количестве конъюгатов нейротоксина **NT2** с флуоресцеином (FITC), красителем **Alexa Fluor 488 (AF488)** и цианином (Cy5) для их последующего применения для визуализации рецепторов в био-ткани. Для этого предстояло достигнуть высокого выхода реакции (отношения количества вещества полученного конъюгата к исходному количеству вещества токсина) путем подбора оптимальных ее условий.

Общие соображения

- 1) следует брать избыток метки над токсином.
- 2) предпочтительно использовать щелочную среду, так как в ней происходит депротонирование аминогрупп. С другой стороны, нужно учитывать дестабилизацию комплексов в растворе при высоких значениях pH.

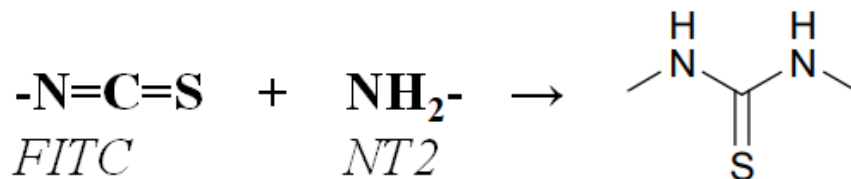
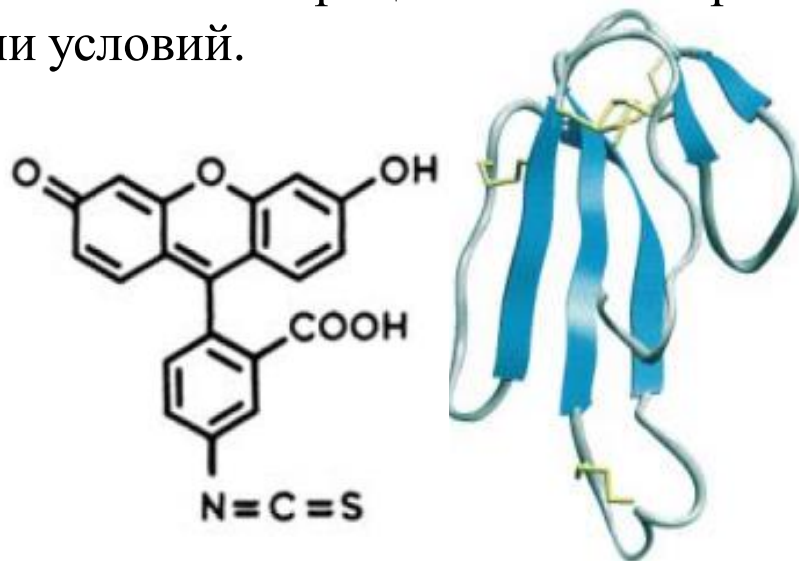
Также, следует параллельно учитывать максимальную растворимость красителя в DMSO, и то, что концентрация белка должна быть не меньше 2 мг/мл, а содержание буфера должно превалировать.

- Параметры подбирались экспериментально в процессе многократного повторения реакции при варьировании условий.

1. Синтез NT2-FITC:

- 1) растворить 2 мг NT2 в 0.5 мл карбонатного буфера (pH 10.5);
- 2) растворить 1 мг FITC в 0.2 мл DMSO;
- 3) смешать оба раствора (на вортексе) и инкубировать (минимум 8 часов).

Концентрации NT2 и FITC в итоговом растворе составляли 0.4 мМ и 3.7 мМ (~1:8).



2. Также нами был приготовлен NT2, меченный Alexa Fluor 488 (AF488). Благодаря наличию NHS AF488 образует стабильные связи с белками.

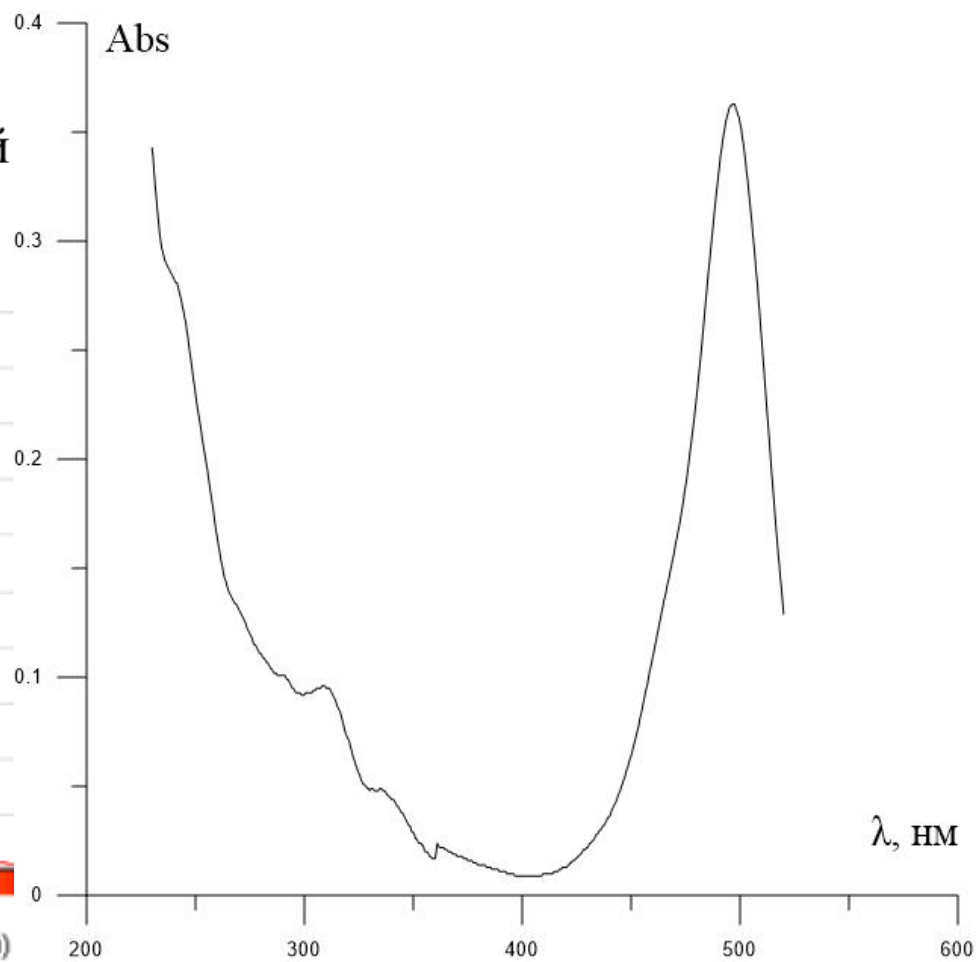
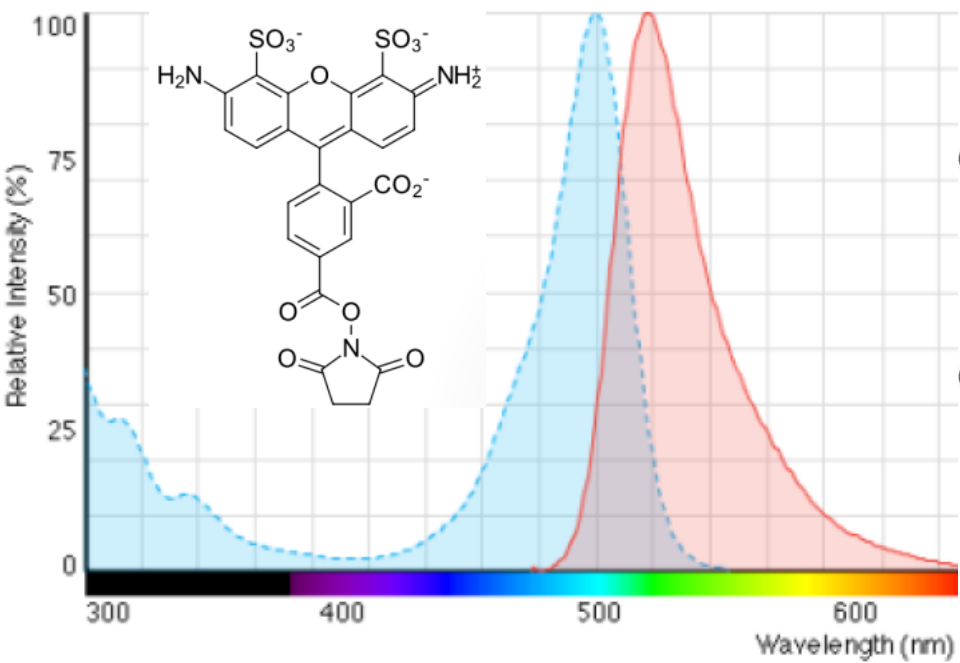
Ход реакции активированного эфира с амином существенно зависит от pH: при высоком pH происходит гидролиз активированного эфира.

В связи с этим, pH буферной смеси был понижен до 8.5.

спектр поглощения NT2-AF488



Образование связи NHS с аминогруппой



3. Также в качестве метки был опробован краситель **Cy5** (Cyanine5): этот краситель малорастворим в воде (в отличие, например, от красителей с сульфо-группами).
- Гидрофобность красителя не позволяет обеспечить его избыток над токсином вследствие его выпадения в осадок в водном буфере.
 - Трудно отделить NT2-Cy5 от несвязанного красителя (что является одним из этапов его очистки), так как используемый при хроматографии буфер является водным раствором.

Альтернативный метод разделения – осаждение – требовал больше времени и был менее точен.

Был сделан вывод о том, что в водных растворах предпочтительней работать с гидрофильными метками.

В результате, был разработан протокол конъюгирования токсина NT2 с рядом флуоресцентных меток; при этом были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие высокий выход реакции, что позволило получить необходимый конъюгат.

Был сделан вывод о превалирующем влиянии значения рН водного раствора на выход реакции, а также о необходимости обеспечения достаточного избытка метки (~8:1).