

Мечение олигонуклеотидов и ДНК методом клик-химии

Клик-химия — это совокупность разнообразных реакций, которые могут быть использованы для синтеза различных конъюгатов. Практически любую биомолекулу можно легко пометить путем конъюгации с небольшими молекулами, такими как флуоресцентные красители, биотин и др., методом клик-химии. Реакция клик-химии происходит между двумя компонентами: **азидом** и **алкином (терминальным ацетиленом)**. Поскольку азидная и алкиновая группы практически не встречаются в природных биомолекулах, реакции между ними отличаются высокой биоортогональностью и специфичностью. При необходимости пометить **олигонуклеотид**, можно заказать его алкин-модифицированную форму.

Протокол

Для мечения алкин-модифицированных олигонуклеотидов с помощью азидов производства компании Lumiprobe, мы рекомендуем использовать следующий протокол. [Вспомогательные реагенты](#) можно также заказать в компании Lumiprobe.

1. Рассчитайте объемы реагентов, необходимых для мечения методом клик-химии, согласно таблице, приведенной ниже. Подготовьте необходимые исходные растворы (см. Приложение).

Реагент	Конечная концентрация в смеси	Концентрация исходного раствора
Олигонуклеотид, алкин-модифицированный	Варьирует (20–200 мкМ)	Варьирует
Азид	В 1,5 раза больше конечной концентрации олигонуклеотида	10 мМ в ДМСО
ДМСО	50 об. %	—
Аскорбиновая кислота	0,5 мМ	5 мМ в воде
Медь(II)-ТБТА	0,5 мМ	10 мМ в 55 об. % ДМСО

2. Растворите **алкин-модифицированный олигонуклеотид** или ДНК в воде в герметичной пробирке.
3. Добавьте **2 М триэтиламмоний-ацетатный буфер (рН 7,0)** до конечной концентрации 0,2 М.
4. Добавьте **ДМСО** и перемешайте на вортексе.
5. Добавьте **исходный раствор азиды** (10 мМ в ДМСО) и перемешайте на вортексе.
6. Добавьте к смеси требуемый объем **5 мМ исходного раствора аскорбиновой кислоты** и кратко перемешайте на вортексе.
7. Дегазируйте раствор барботированием инертного газа в течение 30 с. Можно использовать азот, аргон или гелий.
8. Добавьте к смеси необходимое количество **10 мМ исходного раствора меди(II)-ТБТА** в 55 об. % ДМСО. Продуйте пробирку инертным газом и закройте крышку.
9. Тщательно перемешайте смесь на вортексе. Если наблюдается значительное выпадение в осадок азиды, нагрейте

пробирку в течение 3 мин при 80°C и перемешайте смесь на вортексе.

10. Оставить на ночь при комнатной температуре.
11. Осадите конъюгат ацетоном (для олигонуклеотидов) или этанолом (для ДНК).

Для осаждения конъюгата олигонуклеотида:

добавьте к смеси минимум 4-кратный объем 3% раствора перхлората лития в ацетоне (если объем смеси большой, разделите её на несколько пробирок).

Для осаждения конъюгата ДНК:

добавьте ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М к смеси;

добавьте 2,5 объема этанола (или 0,8 объема изопропанола).

Тщательно перемешайте и выдержите в течение 20 мин при -20°C.

12. Центрифугируйте при 10000 об/мин в течение 10 мин.
13. Удалите супернатант.
14. Промойте осадок ацетоном (1 мл), центрифугируйте при 10000 об/мин в течение 10 мин.
15. Удалите супернатант, высушите осадок и очистите конъюгат с помощью ОФ ВЭЖХ или ПААГ.

Приложение. Приготовление исходных растворов реагентов для мечения методом клик-химии.

5 мМ исходный раствор аскорбиновой кислоты

Приготовление

Растворите 18 мг аскорбиновой кислоты в 20 мл дистиллированной воды.

Хранение

Аскорбиновая кислота легко окисляется на воздухе. Раствор стабилен в течение суток. Для клик-химии используйте свежий раствор.

10 мМ исходный раствор меди(II)-ТБТА в 55 об. % ДМСО

Приготовление

Растворите 50 мг сульфата меди(II) пятиводного в 10 мл дистиллированной воды. Растворите 116 мг ТБТА (лиганда) в 11 мл ДМСО. Смешайте два раствора.

Хранение

Храните при комнатной температуре. Раствор стабилен в течение нескольких лет.

2 М триэтиламмоний-ацетатный буфер (рН 7,0)

Приготовление

Смешайте 2,78 мл триэтиламина с 1,14 мл уксусной кислоты. Добавьте воду до общего объема 10 мл, доведите рН до 7,0.

Хранение

Хранить при комнатной температуре. Раствор стабилен в течение нескольких лет.

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