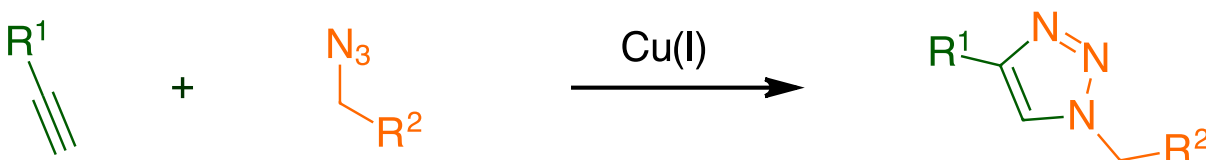


Протокол конъюгации олигонуклеотидов, модифицированных алкином, с азидами красителей

Каталитический буфер для клик-химии предназначен для постсинтетической конъюгации олигонуклеотидов, содержащих алкиновую группу. Олигонуклеотиды с терминальным алкином могут быть синтезированы с использованием [модифицирующего амидита](#), или вы можете [заказать синтез модифицированных олигонуклеотидов](#) у нас на сайте.

Реакция конъюгации происходит между азидом и терминальной группой алкина модифицированного олигонуклеотида и приводит к образованию пятичленного гетероцикла. Поскольку обе группы (азиды и алкина) практически не встречаются в природных биомолекулах, реакция является высокоспецифичной и эффективной для решения широкого спектра задач.



Реакция протекает в присутствии меди (I) и при нейтральных значениях pH. Каталитический буфер содержит медь (II), ацетат триэтиламмония pH 7 и DMSO. Для восстановления меди (II) рекомендуется использовать свежеприготовленный раствор [аскорбиновой кислоты](#).

Для проведения реакции вам понадобятся: модифицированный алкином [олигонуклеотид](#), [азид красителя](#), [каталитический буфер](#) и [аскорбиновая кислота](#). Все реагенты вы можете заказать у нас на сайте.

Протокол

Мы рекомендуем следующий протокол для реакции конъюгации алкин-содержащих олигонуклеотидов с азидами красителей:

1. Определите общий объем реакции исходя из используемого количества олигонуклеотида:

Количество олигонуклеотида	Общий объём реакции, мкл
от 4 до 20 нмоль	100
от 20 до 40 нмоль	200
от 40 до 80 нмоль	400
от 80 до 600 нмоль	600

2. Рассчитайте объемы реагентов для реакции мечения, используя следующую таблицу:

Реагент	Объем, мкл	Концентрация стокового раствора
Азид красителя	(количество олигонуклеотида [нмоль]) × 0.15	10 мМ в ДМСО
Каталитический буфер для клик-химии	(общий объем реакции [мкл]) × 0.67	1.5x
Активатор (аскорбиновая кислота)	(общий объем реакции [мкл]) × 0.02	50 мМ в воде
Вода (для растворения олигонуклеотида)	(общий объем реакции [мкл] — объем раствора азид красителя [мкл] — объем каталитического буфера [мкл] — объем раствора активатора [мкл])	—

3. Приготовьте стоковый раствор *азид красителя* (10 мМ в ДМСО) и *активатора* (аскорбиновой кислоты, 50 мМ в воде).

Обратите внимание, аскорбиновая кислота легко окисляется на воздухе. Используйте только свежеприготовленный раствор активатора (раствор стабилен в течение суток). Для приготовления стокового раствора растворите [10 мг аскорбиновой кислоты](#) в 1.1 мл воды.

4. Растворите олигонуклеотид в рассчитанном объеме *воды* в 2 мл пластиковой пробирке.
5. Добавьте *каталитический буфер для клик-химии* и размешайте на вортексе.
6. Добавьте рассчитанный объем стокового раствора *азид красителя* и еще раз хорошо размешайте на вортексе.
7. *(рекомендуется)*. Дегазируйте смесь для удаления кислорода. Для этого присоедините одноразовый наконечник от автоматической пипетки к пластиковой или силиконовой трубке, подсоединенной к редуктору баллона с инертным газом (аргоном, азотом, гелием). Включите очень слабый поток газа и опустите наконечник в пробирку так, чтобы он находился на 3–10 мм выше уровня жидкости и не касался жидкости и стенок пробирки. Поток газа должен быть таким, чтобы образовывать воронку в жидкости, но не вызывать ее разбрызгивания. Удерживайте наконечник в таком положении в течение 10–20 сек.

Если параллельно происходит постановка нескольких реакций мечения, для дегазирования можно использовать прибор типа SpeedVac. Для этого установите пробирки в прибор, включите вращение, затем на 30–40 сек включите вакуум и сбросьте его, подавая на вход прибора инертный газ.

8. Добавьте раствор *активатора (аскорбиновой кислоты)*, затем в течение нескольких секунд продуйте пробирку инертным газом и закройте ее.
9. Размешайте раствор на вортексе. Если в процессе реакции заметно образование осадка, нагрейте пробирку в горячей (70–95 °С) воде до растворения осадка и размешайте раствор на вортексе.
10. Выдержите смесь при комнатной температуре в течение 8–16 часов.
11. Добавьте 2 М раствор перхлората лития (из расчета один объем на 5 объемов реакционной смеси), размешайте раствор на вортексе и добавьте ацетон квалификации «ос. ч.» до 2 мл.
12. Взболтайте пробирку и выдержите 20 мин при -20 °С.
13. Отделите осадок центрифугированием 10000 об/мин, 10 мин. Удалите супернатант.
14. Добавьте к осадку 1 мл ацетона. Встряхните пробирку несколько раз и отделите осадок центрифугированием 10000 об/мин, 10 мин. Удалите супернатант.
15. Высушите осадок при комнатной температуре в открытой пробирке в течение 1 часа или поместите пробирку в термостат при 65 °С на 10 мин.
16. Растворите осадок в воде и очистите целевой продукт с помощью ВЭЖХ.

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