

Protokoll: Click-Chemie-Markierung von Oligonukleotiden und DNA

Click-Chemie ist eine vielseitige Reaktion, die für die Synthese einer Vielzahl von Konjugaten verwendet werden kann. Praktisch beliebige Biomoleküle können beteiligt sein, und die Markierung mit kleinen Molekülen, wie zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoffen, Biotin und anderen Gruppen kann mühelos erzielt werden.

Die Click-Chemie-Reaktion läuft zwischen zwei Komponenten ab: **Azid** and **Alkin (endständiges Acetylen)**. Sowohl Azidgruppen als auch Alkingruppen liegen fast nie in natürlichen Biomolekülen vor. Demzufolge ist die Reaktion stark bioorthogonal und sehr spezifisch. Wenn die Notwendigkeit besteht, ein **Oligonukleotid** zu markieren, können alkinmodifizierte Oligonukleotide kundenspezifisch von zahlreichen Oligosyntheseeinrichtungen und Firmen geordert werden.

Wir empfehlen die Anwendung des folgenden allgemeinen Protokolls für die Click-Chemie-Markierung von alkinmodifizierten Oligonukleotiden mit von Lumiprobe hergestellten Aziden. Die [Hilfsreagenzien](#) können ebenfalls bei Lumiprobe bestellt werden.

1. Berechnen Sie die Volumina der für die Click-Chemie-Markierung benötigten Reagenzien unter Verwendung der untenstehenden Tabelle. Bereiten Sie zudem die benötigten Stammlösungen vor (siehe Anhang).

Reagenz	Endkonzentration	Konzentration der Stammlösung
Oligonukleotid, Alkin-modifiziert	variabel (20–200 μM)	variabel
Azid	1,5-Faches der Oligonukleotid-konzentration	10 mM in DMSO
DMSO	50 % (v/v)	-
Ascorbinsäure	0,5 mM	5 mM in Wasser
Cu-TBTA-Komplex	0,5 mM	10 mM in 55 % (v/v) DMSO

2. Lösen Sie das **alkinmodifizierte Oligonukleotid** bzw. die DNA in einem druckfesten Glasfläschchen in Wasser auf.
3. Geben Sie **2 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7,0** zu, um eine Endkonzentration von 0,2 M zu erreichen.
4. Geben Sie **DMSO** zu und schütteln Sie.
5. Geben Sie die **Azid-Stammlösung** (10 mM in DMSO) zu und schütteln Sie.
6. Geben Sie das erforderliche Volumen der **5 mM Ascorbinsäure-Stammlösung** hinzu und schütteln Sie kurz.
7. Entgasen Sie die Lösung, indem Sie 30 Sekunden lang ein Inertgas hindurch leiten. Stickstoff,

Argon oder Helium können für diesen Zweck verwendet werden.

8. Geben Sie das erforderliche Volumen der **10 mM Kupfer(II)-TBTA-Stammlösung in 55 %igem DMSO** zu. Verdrängen Sie die Luft im Glasfläschchen mit Inertgas und verschließen Sie es mit einem Stopfen.

9. Schütteln Sie die Lösung gründlich. Sollten Sie eine signifikante Ausfällung von Azid beobachten, erwärmen Sie das Glasfläschchen drei Minuten lang bei 80 °C und schütteln Sie es.

10. Bewahren Sie die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur auf.

11. Fällern Sie das Konjugat mit Aceton (bei Oligonukleotiden) bzw. mit Ethanol (bei DNA) aus. Geben Sie mindestens das vierfache Volumen an Aceton zu der Lösung hinzu (bei einem großen Volumen an Reaktionslösung teilen Sie diese auf mehrere Glasfläschchen auf). Mischen Sie gründlich und inkubieren Sie das Gemisch 20 min lang bei -20 °C.

12. Zentrifugieren Sie zehn Minuten lang bei 10.000 U/min.

13. Verwerfen Sie den Flüssigkeitsüberstand.

14. Waschen Sie das Pellet mit 1 ml Aceton und zentrifugieren Sie zehn Minuten lang bei 10.000 U/min.

15. Verwerfen Sie den Flüssigkeitsüberstand, trocknen Sie das Pellet und reinigen Sie das Konjugat mittels RP-HPLC oder PAGE.

Anhang. Zubereitung von Stammlösungen und Reagenzien für die Click-Chemie-Markierung

5 mM Ascorbinsäure-Stammlösung

Zubereitung	Lösen Sie 18 mg Ascorbinsäure in 20 ml destilliertem Wasser auf.
Aufbewahrung	Ascorbinsäure ist anfällig für Oxidation durch Luftsauerstoff. Die Lösung ist einen Tag lang stabil. Verwenden Sie jeweils frisch zubereitete Lösungen.

10 mM Kupfer(II)-TBTA-Stammlösung in 55 %igem DMSO

Zubereitung	Lösen Sie 25 mg Kupfer(II)-Sulfatpentahydrat in 10 ml destilliertem Wasser auf. Lösen Sie 58 mg TBTA-Ligand in 11 ml DMSO auf. Mischen Sie beide Lösungen.
Aufbewahrung	Bewahren Sie die Lösung bei Raumtemperatur auf. Die Lösung ist über Jahre hinweg stabil.

2 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 7,0

Zubereitung

Mischen Sie 2,78 ml Triethylamin mit 1,14 ml Essigsäure. Füllen Sie auf ein Volumen von 10 ml auf und stellen Sie den pH-Wert auf 7,0 ein.

Aufbewahrung

Bewahren Sie die Lösung bei Raumtemperatur auf. Die Lösung ist über Jahre hinweg stabil.