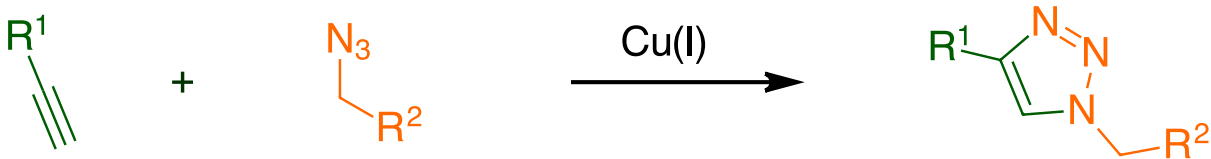


Protokoll: Click-Chemie-Markierung von alkinmodifizierten Oligonukleotiden mit Aziden

[Puffer für Click-Chemie](#) dient der postsynthetischen Konjugation von alkinmodifizierten Oligonukleotiden. Oligonukleotide mit terminalen Alkinen können mithilfe von [Alkinamidit](#) synthetisiert werden.

Bei der Konjugationsreaktion eines Azids mit der terminalen Alkingruppe eines Oligonukleotids wird ein 5-gliedriger Heterozyklus gebildet. Da Azid- und Alkingruppen in natürlichen Biomolekülen praktisch nie vorkommen, ist die Reaktion sehr spezifisch und kann für eine effektive Lösung eines breiten Aufgabenspektrums eingesetzt werden.



Die Reaktion verläuft in Anwesenheit von Kupfer (I) und bei neutralem pH-Wert. Der Puffer enthält Kupfer (II), Triethylammoniumacetat pH 7 und DMSO. Es wird empfohlen, Kupfer (II) mit einer frisch angesetzten [Ascorbinsäure](#)-Lösung zu reduzieren.

Für die Reaktion benötigen Sie folgende Komponenten: alkin-modifiziertes Oligonukleotid, [Azid](#), [Puffer für Click-Chemie](#) und [Ascorbinsäure](#). Sie können die Reagenzien auf unserer Homepage bestellen.

Protokoll

Wir empfehlen folgendes Protokoll für die Click-Chemie-Markierung von alkinmodifizierten Oligonukleotiden mit Aziden:

1. Berechnen Sie das Gesamtreaktionsvolumen abhängig von der Menge des Oligos:

Gesamtreaktionsvolumen, μ l	Oligonukleotidmenge
100	von 4 bis 20 nmol
200	von 20 bis 40 nmol
400	von 40 bis 80 nmol
600	von 80 bis 600 nmol

2. Berechnen Sie die Volumina der für die Click-Chemie-Markierung benötigten Reagenzien anhand der untenstehenden Tabelle:

Reagenz	Volumen, μ l	Konzentration der Stammlösung
Azid	$(\text{Menge des Oligonukleotids [nmol]}) \times 0,15$	10 mM in DMSO
Puffer für Click-Chemie	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}]) \times 0,67$	1,5x
Ascorbinsäure	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}]) \times 0,02$	50 mM in Wasser
Wasser (zum Auflösen des Oligonukleotids)	$(\text{Gesamtreaktionsvolumen } [\mu\text{l}] - \text{Volumen der Azidlösung } [\mu\text{l}] - \text{Puffervolumen } [\mu\text{l}] - \text{Volumen der Ascorbinsäurelösung } [\mu\text{l}])$	—

3. Stellen Sie die Stammlösungen *des Azids* (10 mM in DMSO) und der *Ascorbinsäure* (50 mM in Wasser) her.
Beachten Sie bitte, dass Ascorbinsäure anfällig für Oxidation durch Luftsauerstoff ist. Verwenden Sie daher immer nur frisch angesetzte Lösungen (die Lösung ist 24 Stunden lang stabil). Bereiten Sie die Stammlösung zu, indem Sie [10 mg Ascorbinsäure](#) in 1,1 ml Wasser auflösen.
4. Lösen Sie das alkinmodifizierte Oligonukleotid im zuvor berechneten *Wasservolumen* in einem 2 ml Plastikröhrchen auf.
5. Fügen Sie *den Puffer für Click-Chemie* hinzu und vortexen Sie.
6. Fügen Sie *die Azid-Stammlösung* hinzu und vortexen Sie noch einmal gut.
7. (*Empfohlen*). Entgasen Sie die Lösung. Schließen Sie dafür eine Einmalpipettenspitze an den Plastik- bzw. Silikonschlauch des Druckreglers der Flasche mit Inertgas (Argon, Stickstoff, Helium) an. Stellen Sie einen sehr schwachen Gasstrom ein und halten Sie die Pipettenspitze 3–10 mm oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Berühren Sie dabei weder Flüssigkeit noch Röhrchenwände. Der Gasstrom muss so eingestellt sein, dass er einen Strudel in der Flüssigkeit erzeugt, das Verspritzen der Flüssigkeit ist jedoch zu vermeiden. Halten Sie die Pipettenspitze so 10–20 s lang.
Werden mehrere Markierungsreaktionen parallel vorbereitet, kann mit Geräten wie SpeedVac entgast werden. Platzieren Sie die Röhrchen im Gerät, starten Sie den Durchlauf, bauen Sie für 30–40 s Vakuum auf und belüften Sie das Gerät anschließend mit Inertgas.
8. Fügen Sie die *Ascorbinsäure-Lösung* hinzu, leiten Sie einige Sekunden lang ein Inertgas durch das Röhrchen hindurch und

verschließen Sie es.

9. Vortexen Sie die Lösung. Flockt die Lösung bei der Reaktion aus, erwärmen Sie das Röhrchen in heißem Wasser (70–95 °C) bis sich der Niederschlag löst und vortexen Sie.
10. Inkubieren Sie das Gemisch bei Raumtemperatur für 8–16 Stunden.
11. Fügen Sie 2 M Lithiumperchlorat-Lösung (ein Teil Lithiumperchlorat-Lösung auf fünf Teile des Reaktionsgemisches), vortexen Sie und füllen Sie ad 2 ml mit hochreinem Aceton auf.
12. Schütteln Sie das Röhrchen und inkubieren Sie bei -20 °C für 20 Minuten.
13. Zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 10 000 min⁻¹. Verwerfen Sie den Überstand.
14. Waschen Sie das Pellet mit 1 ml Aceton. Schütteln Sie das Röhrchen und zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 10 000 min⁻¹. Verwerfen Sie den Überstand.
15. Trocknen Sie das Pellet im geöffneten Röhrchen für eine Stunde bei Raumtemperatur oder stellen Sie das Röhrchen in einen Heizblock bei 65 °C für 10 Minuten.
16. Lösen Sie das Pellet in Wasser auf und reinigen Sie das Konjugat mittels RP-HPLC.

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

Biotech Industry Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com