

## 寡核苷酸和 DNA 的点击化学标记

点击化学反应发生在两个组分之间，叠氮化物和炔烃（末端乙炔）。叠氮基和炔基在天然生物分子中几乎从未出现过。因此，此反应是高度生物正交和特异性的。如果需要标记寡核苷酸，炔烃修饰的寡核苷酸可以在很多寡聚合定制的设备 and 公司订购。

我们建议您根据以下常规实验步骤用 ApexBio 公司的叠氮化物对炔烃修饰的寡核苷酸进行点击化学标记。

1. 根据以下表格计算点击化学标记反应所需要的试剂体积。根据附录准备所需的储备溶液。

试剂	在混合物中的最终浓度	储备溶液浓度
寡核苷酸，炔烃修饰	多样 (20 – 200 uM)	多样
叠氮化物	1.5 x (寡核苷酸浓度)	10 mM, 溶解在 DMSO 中
DMSO	50 vol %	-
抗坏血酸	0.5 mM	5 mM, 溶解在水中
铜-TBTA 络合物	0.5 mM	10 mM, 溶解在 55 vol% DMSO 中

2. 在耐压瓶中将炔烃修饰的寡核苷酸或 DNA 溶解于水中。
3. 加入浓度为 2 M、pH 值为 7.0 的三乙基乙酸铵缓冲液，至终浓度为 0.2 M。
4. 加 DMSO，涡旋。
5. 加入叠氮化物储备液（10 mM，溶解在 DMSO 中），涡旋。
6. 向混合物中加入所需体积的 5 mM 抗坏血酸储备液，并短暂涡旋。
7. 在混合物中鼓泡惰性气体 30 秒使溶液脱气。可以使用氮气，氩气或氦气。
8. 向混合物中加入所需量的溶解在 55% DMSO 中的 10 mM 铜（II）-TBTA 储备液。用惰性气体冲洗样品瓶，盖紧盖子。
9. 彻底涡旋混合物。如果观察到明显的叠氮化物沉淀，在 80°C 下加热小瓶 3 分钟，并涡旋。
10. 在室温下放置过夜。
11. 用丙酮（对于寡核苷酸）或用乙醇（对于 DNA）沉淀缀合物。向混合物中加入至少 4 倍体积的丙酮（如果混合物的体积大，分成几个小瓶）。充分混合，并在 -20 °C 下放置 20 分钟。
12. 10000 rpm 离心 10 分钟。

13. 弃去上清液。
14. 用丙酮（1 mL）洗涤沉淀，在 10000 rpm 条件下离心 10 分钟。
15. 弃去上清液，干燥沉淀，并通过 RP-HPLC 或 PAGE 纯化缀合物。

**附录：**

**5 mM 抗坏血酸储备溶液**

<b>制备</b>	将 18 mg 抗坏血酸溶解于 20 mL 蒸馏水中。
<b>储存</b>	抗坏血酸容易被空气氧化。制备的溶液可稳定存储一天。如果用于点击化学反应，请现配现用。

**溶解在 55% DMSO 中的 10 mM 铜 (II)-TBTA 储备液**

<b>制备</b>	将 50 mg 五水硫酸铜（II）溶于 10 mL 蒸馏水中。将 116 mg TBTA 配体溶解在 11 mL DMSO 中。混合两种溶液。
<b>储存</b>	在室温下储存。可存放数年。

**2M 三乙基乙酸铵缓冲液，pH 7.0**

<b>制备</b>	将 2.78 mL 三乙胺与 1.14 mL 乙酸混合。加水至 10 mL 体积，并将 pH 调节至 7.0。
<b>储存</b>	在室温下储存。可存放数年。