

マレイミド修飾オリゴ DNA

■ マレイミドとは

マレイミド基はチオール基 (-SH) の求核付加 (マイケル付加) を受けて結合を形成するため、結合リンカーとして広く用いられる活性基の一つです。主として蛍光体、その他の標識体に活性基としてマレイミドを結合させた誘導体を用い、結合主体物質側にチオール基を導入したものと反応させることによって目的物を付加反応により得ることができます。

■ 日本遺伝子研究所で行っている主な事例

- ・ 5'末端へマレイミドを修飾したオリゴ DNA 受託合成 (研究用途)

■ 日本遺伝子研究所だからできる特徴

通常の一般的なオリゴ DNA の固相合成の間にマレイミド基を導入することは、固相合成後の処理条件の観点から不可能で、これまでオリゴ DNA にマレイミド基を導入するための一般的な方法は、二官能性試薬とアミノ化オリゴ DNA を反応させることでありました。しかしながら、この反応による収率は決して高いとは言えません。

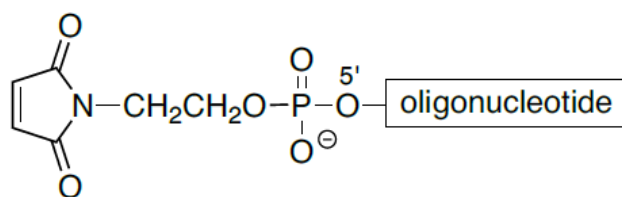
この度、我々が用いるマレイミド修飾試薬は、保護されたマレイミド誘導体をオリゴ DNA 固相合成中に結合させるタイプのもので、固相合成後のオリゴ DNA 処理条件においてもマレイミドが保護された状態を保ちます。

このマレイミドのみが保護された状態が最も安定です。基本的にこの状態でのお受け取りをお勧めいたします (乾燥品での納品)。その後、ご使用の直前に保護基を除去 (脱保護) してご使用ください。

(※ マレイミド脱保護方法を本 PDF 2 ページ目以降に記載しています。)

最終的なマレイミド保護基を除去した状態でのお受け取りをご希望の場合は、別途有償にて承ります。この場合も乾燥品での納品となりますので、ご使用直前に pH7.0±0.5 の適切なバッファーへ溶解し、必要に応じて分注してご使用ください。分注後、保管分は溶液のまま直ちに凍結してください。(凍結後 1 週間以内は結合反応に使用可能です。)

完全脱保護後のマレイミド修飾オリゴ DNA 構造式



マレイミド修飾試薬を用いる合成においては、塩基配列部分の合成に用いるアデニン、グアニン、シトシンの各塩基の合成試薬を一般的なオリゴ DNA 合成とは異なった特殊試薬へ置換えなければならず、それには特別な操作が要求されます。

■ アプリケーション例

マレイミド基をもつオリゴ DNA が取り扱えることによって、チオール基をもつタンパク質、ペプチドなどへ直接的にオリゴ DNA を結合させることができ、タンパク質・ペプチドをあらかじめリンカーなどによって修飾する必要がありません。

■ 価格・納期

特殊合成のため、価格等、詳細についてはお問い合わせください。

■ マレイミド保護基の除去方法（脱保護方法）

マレイミド保護基の除去（脱保護）

保護されているマレイミド修飾オリゴ DNA は、逆 Diels-Alder 反応による脱保護によって、活性マレイミドを生成させることができます。逆 Diels-Alder 反応には二つの方法があります。一つはマイクロ波照射によるもので、これは効果的ではありますが、特別な装置を必要とします。もう一つの方法はトルエンを用いるもので、特別な装置を必要とせず、一般の実験室で実施できます。

マイクロ波照射による脱保護

保護されているマレイミド修飾オリゴ DNA 溶液(500~1000 μ L)とメタノール：水=(1:1)=(v/v)の混合液（濃度 25 μ M）をバイアルに注入し、マイクロ波を 90 $^{\circ}$ C で 90 分間照射します。その後、溶媒を真空条件下で除去します。

トルエン中の加熱による脱保護

【概要】

保護されているマレイミド修飾オリゴ DNA 水溶液を、まず乾燥させます。続いて無水アセトニトリルを用いた共沸蒸留、その後無水トルエンを用いた共沸蒸留を 3 回行い乾燥させます。乾燥後、そのオリゴ DNA を 2 mL の無水トルエンに懸濁し、逆 Diels-Alder 反応を 90 $^{\circ}$ C 4 時間行います。逆 Diels-Alder 反応には無水条件が必須です。湿気により不完全な脱保護や加水分解、マレイミドへの水の付加を引き起こす可能性があるので注意が必要です。最後にトルエンを蒸発させ、白色残渣が残れば、脱保護完了です。

【準備する試薬・器具】

- 無水アセトニトリル
- 無水トルエン
(4 Å モレキュラーシーブを入れて少なくとも二日間、乾燥させます。)
- 2.5 mL 気密性シリンジ（ルアーアダプター式）
- 4 mL スクリューキャップバイアル
- 4 mL スクリューキャップ（穴あき）
- 11 mm セブタム
- 16-gauge ニードル, 1-1/2 インチ, 先端フラットタイプ
- 20-gauge ニードル, 1-1/2 インチ
- 40 $^{\circ}$ C までのウォーターバス付きロータリーエバポレーター
- 75 mL 凍結乾燥フラスコ（例：VirTis 社 312900）
- エバポレータートラップ 14/20 アダプター（例：Ace Glass 社 6704-04）

【手順】

1. 滅菌済 4 mL スクリューキャップバイアルに 50 nmol の保護されているマレイミド修飾オリゴ DNA 溶液を分注します。
2. その溶液を真空濃縮器で乾燥させます。
3. バイアルに 2 mL の無水アセトニトリルを加えます。（オリゴ DNA はアセトニトリルに溶解しません。）

4. セプタムと穴あきスクリューキャップをバイアルに取り付けます。
5. 取り付けしたセプタムに 16-gauge ニードルを挿入します。
6. ロータリーエバポレーターの凍結乾燥フラスコ内にそのバイアルを置き、突沸させないようにゆっくりと減圧し、アセトニトリルを蒸発させます。20 分程度で蒸発が完了します。真空開放の際には、ロータリーエバポレーターに乾燥アルゴンガスを充填してください。
7. 2.5 mL シリンジと 20-gauge ニードルを 2 mL の無水トルエンでリンスします。その後、そのシリンジを用いてバイアルに 2 mL の無水トルエンを加えます。無水トルエンを加える際には、先に挿入してある 16-gauge ニードルは取り外さず、そのまま 16-gauge ニードルに 20-gauge ニードルを挿入して注入します。したがって、この作業はバイアルをフラスコ内に置いたままで行います。
8. 37°Cウォーターバスを使用して、突沸させないようにゆっくりと減圧させながらトルエンを蒸発させます。20 分程度で蒸発が完了し、白色残渣がバイアルの下部に現れます。真空開放の際には、ロータリーエバポレーターに乾燥アルゴンガスを充填してください。
9. 7~8 の無水トルエンによる乾燥作業を、さらに 2 回繰り返します。
10. ロータリーエバポレーターからフラスコを取り外します。
11. 7 と同様に 2 mL の無水トルエンをバイアルに加え、16-gauge ニードルをセプタムから取り外した後、フラスコからバイアルを取り出します。
12. そのバイアルを 90°C のヒートブロック上に 4 時間ほど静置させます。
13. バイアルを室温まで冷却させた後、16-gauge ニードルをセプタムに挿入し、ロータリーエバポレーターによってトルエンを蒸発させます。
14. これで脱保護は完了です。pH:7.0±0.5 の適切なバッファーに溶解して、ご使用ください。必要に応じて分注可能ですが、分注したものは溶液のまま、直ちに凍結保存してください。凍結保存した溶液は一週間以内で結合反応に使用できます。