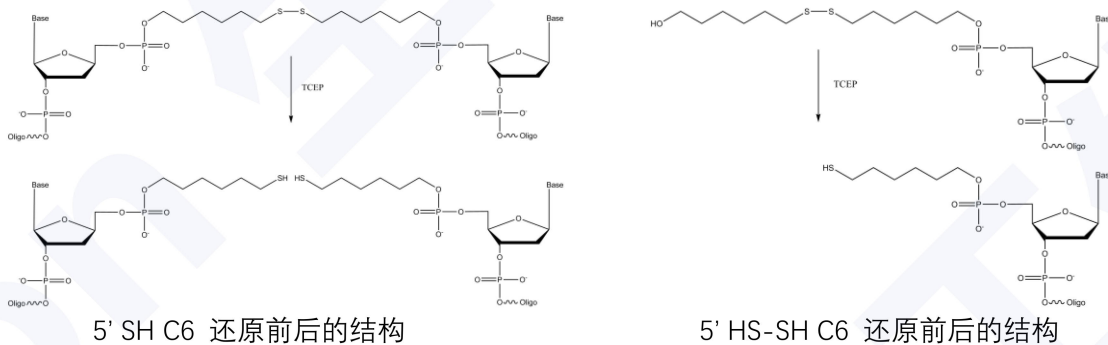


巯基修饰 Oligo 的还原方法

巯基修饰 Oligo 的形式：

生工生物提供两种形式的巯基修饰形式，分别是 SH-Oligo 和 HS-SH-Oligo，其中 SH-Oligo 为裸露的巯基，SH-Oligo 在运输或者保存过程中能够自发的发生氧化，形成带有二硫键的二聚体结构。而 HS-SH-Oligo 则是巯基被二硫键保护的形式。

这两类巯基修饰 DNA 都需要在使用前进行还原处理。还原前后的结构如下图所示：



我们推荐使用 TCEP (三-(2-甲酰乙基) 膦盐酸盐，生工产品编号 A600974) 作为巯基修饰的 DNA 使用的还原剂，TCEP 粉末可以使用纯水来进行溶解。

巯基修饰 Oligo 的还原办法：

1. 巯基修饰的 DNA 推荐使用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris.HCl; 1 mmol/L EDTA，生工产品编号 B548106) 溶解到 100 μ M，之后可以根据实验需要稀释到所需要的浓度。
2. 如果用于与金电极相连，将 1 μ l 的 1 mM TCEP 与 99 μ l 的巯基修饰的 DNA (浓度为 0.2 μ M) 混合，室温下还原 30~60 分钟^[1]，还原之后的 DNA 可以不去除 TCEP 用于后续实验。如果需要更高浓度的 DNA 溶液，比如 100 μ M，则需要使用 10 mM TCEP 的进行还原^[2]。TCEP 物质的量需要在 DNA 物质的量的 100 倍或以上。
3. 如果用于与纳米金连接，可将 200 μ l 的 15 μ M 的巯基修饰的 DNA 与 5 μ l 的 1 M 的 TCEP 混合，室温下还原 30 min。后续可以直接与纳米金溶液混合^{[3][4]}。

替代的还原剂：

DTT (二硫苏糖醇，生工产品编号 A100281) 也可以用于巯基修饰的 DNA 的还原，但是因为含有巯基，还原之后必须除去。可以使用 DTT 溶液 (0.1 M DTT, 0.18 M PB, PH 8.0) 溶解干粉 DNA 到适宜的浓度，之后葡聚糖凝胶柱 (比如 NAP-25) 进行脱盐处理，去除 DTT，之后可以用于后续实验^[5]。

注意事项：

1. 本公司提供的还原办法均参考自相关文献，不保证实际实验效果。
2. TCEP 在宽的 PH 范围 (1.5-9.0) 均有还原作用，两种还原剂还原后的 DNA 需要现用现配，不能长时间保存。
3. 同时带有亚甲基蓝和巯基修饰的 DNA，在还原时溶液颜色可能从蓝色变成无色，此为正常情况，依然可以完成

电化学信号的测定, 详见参考文献[2]。

参考文献

1. Zhang J, Song S, Wang L, Pan D, Fan C. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2888-95. DOI: 10.1038/nprot.2007.419.
2. Xiao Y, Lai RY, Plaxco KW. Preparation of electrode-immobilized, redox-modified Oligonucleotides for electrochemical DNA and aptamer-based sensing. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2875-80. DOI: 10.1038/nprot.2007.413.
3. Cordray MS, Amdahl M, Richards-Kortum RR. Gold nanoparticle aggregation for quantification of Oligonucleotides: optimization and increased dynamic range. *Anal Biochem.* 2012 Dec 15;431(2):99-105. DOI: 10.1016/j.ab.2012.09.013.
4. Liu J, Lu Y. Colorimetric Cu²⁺ detection with a ligation DNAzyme and nanoparticles. *Chem Commun (Camb).* 2007 Dec 14;(46):4872-4. DOI: 10.1039/B712421J.
5. Hurst SJ, Lytton-Jean AK, Mirkin CA. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem.* 2006 Dec 15;78(24):8313-8. DOI: 10.1021/ac0613582.