Ферментативное мечение ДНК с помощью флуоресцентных трифосфатов

Флуоресцентно-меченые трифосфаты используют для включения флуоресцентной метки в растущую цепь ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В ходе амплификации с добавлением в реакционную смесь меченых дезоксинуклеотидов происходит их ферментативное встраивание и наработка меченого ПЦР-продукта Taq-полимеразой. Введение флуоресцентных меток непосредственно в процессе ПЦР имеет преимущества в условиях ограниченного количества ДНК-матрицы или необходимости наработки определенного фрагмента ДНК.

В данном протоколе приведены общие рекомендации по постановке ПЦР с флуоресцентно-мечеными трифосфатами и последующей детекции полученного продукта амплификации в агарозном геле. Указанные ниже параметры (включая программу амплификации, концентрацию ДНК-матрицы, праймеров и флуоресцентного дезоксинуклеотида, а также количество ПЦР-продукта, вносимого в агарозный гель) рекомендуется оптимизировать под конкретные условия эксперимента.

Для амплификации ДНК, меченой флуоресцентными трифосфатами, можно использовать 5-кратную реакционную смесь ProbeMaster® UNI (в состав которой входит HS Taq-ДНК-полимераза, реакционный буфер с Mg^{2+} и смесь немеченых трифосфатов).

Приготовление раствора флуоресцентного трифосфата

1. Растворите лиофилизированный флуоресцентный трифосфат деионизированной водой до стоковой концентрации 1 мМ* (например, к 50 нмоль лиофилизата добавьте 50 мкл воды).
2. Тщательно перемешайте раствор, сбросьте капли центрифугированием.

   Важно! Полученный раствор флуоресцентного трифосфата рекомендуется хранить в темноте, а дальнейшую экспериментальную работу проводить в условиях низкой освещенности.

* — разведение лиофилизата до стоковой концентрации 1 мМ и добавление удобно отмеряемого объема раствора трифосфата в ПЦР-смесь (3,5–7 мкл на объем реакции 35 мкл, см. пункт 1 раздела «Мечение ДНК») повышает точность внесения необходимого количества модифицированного трифосфата в реакцию.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Мечение ДНК

1. Смешайте компоненты для необходимого числа реакций мечения согласно приведённой ниже таблице. Готовую смесь перемешайте и сбросьте капли центрифугированием.

   Расчет на 1 реакцию объемом 35 мкл:**

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для ПЦР ProbeMaster UNI, 5x	7 мкл	—
Прямой праймер	0,7–2,1 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 200–600 нМ
Обратный праймер	0,7–2,1 мкл 10 мкМ раствора	
Флуоресцентно-меченый трифосфат	3,5–7 мкл 1 мМ раствора	Конечная концентрация 0,1–0,2 мМ***
Деионизированная вода	Добавляется до общего объема реакции 35 мкл**	—
ДНК	Объем образца рассчитывается в зависимости от типа и концентрации ДНК-матрицы. В качестве матрицы может быть использована плазмидная (1–100 пг), геномная (50–100 нг) ДНК и др.	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. пункт 3)
Общий объем реакции	**35 мкл****	

** – при использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

*** – количественное содержание флуоресцентного трифосфата может повлиять на выход ферментативной реакции и степень мечения продукта. Для реакций мечения флуоресцентные трифосфаты рекомендуется добавлять в ПЦР-смесь до конечной концентрации 0,1–0,2 мМ (т.е., в соотношениях 0,5:1 – 1:1 к соответствующему немеченому трифосфату), однако для каждого типа меченого трифосфата советуем отдельно подбирать его наиболее оптимальную концентрацию в реакционной смеси. Увеличение концентрации меченых дезоксинуклеотидов в реакции может приводить к ингибированию ПЦР.

Важно! При добавлении флуоресцентных трифосфатов количество наработанного ПЦР-продукта может быть ниже, чем при использовании в реакции только немеченых нуклеотидов.

2. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
3. Отдельно в каждую пробирку внесите недостающий объем образца ДНК. Закройте крышки пробирок, сбросьте капли центрифугированием.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

4. Проведите стандартную амплификацию ДНК с использованием нижеуказанной программы.

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Первичная денатурация, активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10–30 с	25–35
Отжиг праймеров	Рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров	10–30 с	
Элонгация	72°C	15–60 с (время элонгации зависит от длины ампликонов)	
Финальная достройка цепи	72°C	5 мин	1

5. Флуоресцентно-меченый ПЦР-продукт может быть визуализирован на агарозном геле без дополнительного добавления к образцу интеркалирующего красителя.
6. Поскольку флуоресценция свободных меченых нуклеотидов может затруднить визуальную детекцию полученного ПЦР-продукта на гель-электрофорезе, дополнительно рекомендуется провести очистку ДНК от невстроившихся трифосфатов.

Очистка ДНК от трифосфатов

Для получения ярких видимых полос на агарозном геле и удаления бóльшей части свободных флуоресцентных трифосфатов рекомендуется концентрировать ДНК переосаждением ПЦР-продукта этанолом из одной или нескольких пробирок с продуктами амплификации (предварительно объединив их в одну пробирку).

Для полного удаления флуоресцентных дезоксинуклеотидов рекомендуется проведение дополнительной очистки полученного ПЦР-продукта с помощью гель-фильтрации на колонках или ультрафильтрации.

1. К ПЦР-продукту (из одной или нескольких пробирок) добавьте 1/2 объема 5 М раствора ацетата аммония и 2,5–3 объема 96% этанола (например, на каждые 35 мкл раствора с ПЦР-продуктом добавьте 17,5 мкл 5 М ацетата аммония и 87,5–105 мкл 96% этанола). Для лучшей визуализации осадка ДНК на этом этапе мы рекомендуем добавлять соосадитель (для этих целей можно использовать линейный полиакриламид).
2. Для эффективного осаждения ДНК инкубируйте смесь при низких температурах (например, в течение 30–60 минут при -20°C).
3. Центрифугируйте смесь не менее 15 минут при 10 000–12 000 × *g*, после чего аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок.
4. Промойте осадок холодным 70% этанолом, тщательно удалите супернатант.
5. Растворите осадок в 10–20 мкл (в зависимости от желаемой концентрации меченой ДНК после очистки и, соответственно, яркости полос конечного продукта на агарозном геле) воды или элюирующего буфера.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

6. При необходимости продукты амплификации можно хранить при -20°C.

Электрофорез

1. Смешайте образцы с буфером для нанесения на агарозный гель и внесите в лунки геля 5 мкл образца, проведите электрофорез. Для лучшей визуализации флуоресцентно-меченого ПЦР-продукта может потребоваться внесение бóльшего количества образца в лунку, либо растворение ДНК в меньшем объеме элюирующего буфера.
2. По окончании гель-электрофореза осуществите детекцию флуоресценции меченой ДНК с помощью УФ-трансиллюминатора или гель-документирующей системы с применением подходящего светофильтра, в зависимости от спектра эмиссии используемого флуоресцентного трифосфата.

   Важно! Мечение ДНК с использованием модифицированных трифосфатов может вызывать изменения электрофоретической подвижности ПЦР-продукта в агарозном геле.
3. После детекции меченой ДНК инкубируйте гель в растворе красителя (например, dsGreen, dsGold, бромистого этидия) для визуализации немеченого контрольного ПЦР-продукта и маркера длин ДНК.

   Важно! После окрашивания геля флуоресценция меченого ПЦР-продукта может перекрываться с флуоресценцией красителя для геля, поэтому рекомендуется зафиксировать флуоресценцию ДНК до инкубации агарозного геля в растворе красителя.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
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

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

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com