

## Ферментативное мечение ДНК с помощью флуоресцентных трифосфатов

Флуоресцентно-меченные 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 Таф-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 Таф-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 mM\* (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 mM 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.

## Мечение ДНК

- 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-меченный 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)
<b>Общий объем реакции</b>	<b>35 мкл**</b>	

\*\* – 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 немеченному трифосфату), однако для каждого типа меченого трифосфата советуем отдельно подбирать его наиболее оптимальную концентрацию в реакционной смеси. Увеличение концентрации меченых дезоксиконуcléотидов в реакции может приводить к ингибиции ПЦР.

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

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

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	
Отжиг праймеров	Рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров	10–30 с	25–35
Элонгация	72°C	15–60 с (время элонгации зависит от длины ампликонов)	
Финальная достройка цепи	72°C	5 мин	1

- Флуоресцентно-меченный ПЦР-продукт может быть визуализирован на агарозном геле без дополнительного добавления к образцу интеркалирующего красителя.
- 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 большей 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.

- 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](#)).
- Для эффективного осаждения ДНК инкубируйте смесь при низких температурах (например, в течение 30–60 минут при -20°C).
- Центрифугируйте смесь не менее 15 минут при 10 000–12 000 × g, после чего аккуратно удалите супернатант, не задевая осадок.
- Промойте осадок холодным 70% этанолом, тщательно удалите супернатант.
- 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](mailto:order@lumiprobe.com)

### Lumiprobe GmbH

Fedor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

### Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto: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](mailto:hk@lumiprobe.com)

### Lumiprobe LTD

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

### Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center  
No. 59 Ximwen Rd., Meiling Community  
Lianhua Street, Futian District  
Shenzhen, China  
Phone: +86-1471431-6277  
Email: [cn@lumiprobe.com](mailto: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 большего 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.