

## 3'-концевое нерадиоактивное мечение специфических зондов

Набор предназначен для получения меченых биотином или флуоресцеином ДНК или олигонуклеотидов. Процесс мечения осуществляется путем добавления меченого биотин-11-dUTP или флуоресцеин-12-dUTP, к концевой 3'-ОН группе ДНК. При этом на 3'-конце ДНК образуется гомополимерный «хвост» из добавляемого нуклеотида.

Полученный меченый зонд можно использовать для гибридизации в Southern или Northern блотах, а также (**это является основным преимуществом данного набора !**) для выявления и выделения уникальных последовательностей нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). Пометив при помощи данного набора уникальный зонд вы можете отслеживать экспрессию уникального гена, выделяя и измеряя количество экспрессируемой мРНК.

Дополнением к этому набору, позволяющие использовать его преимущества с максимальной эффективностью, могут быть следующие наборы, производимые нашей фирмой:

- Выделение полноразмерной поли(А) мРНК на магнитных частицах
- Выделение полноразмерной специфической мРНК на магнитных частицах
- Выделение тотальной РНК на магн. частицах, покрытых SiO<sub>2</sub> (бесфенольное выделение)
- Выделение тотальной РНК (YellowSolve)
- ОТ ПЦР (RT PCR)

### Состав набора

(набор рассчитан на 20 реакций мечения)

№	Компоненты набора	Количества	Условия хранения
1	Терминальная дезоксиинуклеотидил трансфераза, 20 ед./мкл	300 ед.	-20 °С
2	х5 Реакционный буфер	200 мкл	-20 °С
3	Биотин-11-dUTP или Флуоресцеин-12-dUTP, 1 мМ водн. раствор	20 мкл	-20 °С
4	dATP, 10 мМ водн. раствор	30 мкл	-20 °С
5	Деионизированная вода	1 мл	-20 °С
6	0.5 М ЭДТА, рН 8.0	50 мкл	-20 – +20 °С

### Протокол постановки реакции мечения

- 1 смешайте следующие компоненты реакционной смеси:

- х5 реакционный буфер	4 мкл
- олигонуклеотид	100 пмолей
- биотин-11-dUTP/флуоресцеин-12-dUTP, 1 мМ	1 мкл
- dATP, 10 мМ	1 мкл
- терминальная трансфераза	0.5 мкл
- деионизированная вода до конечного объема	20 мкл

- 2 инкубируйте реакционную смесь при +37 °С в течении 60 минут.
- 3 остановите реакцию нагреванием смеси при +70 °С в течении 10 минут или добавлением 2 мкл 0.5 М ЭДТА (рН 8.0).

**Таблица 1.** Количество олигонуклеотида (нг) эквивалентное 100 пмолям

Длина олигонуклеотида	Количество олигонуклеотида (нг) эквивалентное 100 пмолям
15 - мер	500 нг
18 - мер	600 нг
24 - мер	800 нг
31 - мер	1050 нг

В приближении, нг олигонуклеотида = пмоль олигонуклеотида x 0.33 x N,  
где N = длина олигонуклеотида в основаниях

### Примечание

- Эффективность мечения и длина гомополимерного «хвоста» зависит от многих факторов, включая такие, как соотношение олигонуклеотид : нуклеотид, длина олигонуклеотида, время реакции, температура. Использование в данном наборе dATP позволяет получать «хвост» оптимальной длины с максимальным включением меченого основания (до 10 меченых молекул). Можно не добавлять dATP, тогда количество меченых молекул сокращается в 3-4 раза.
- Соотношение фермент : субстрат также играет критическую роль при мечении. Обычно, 0.5 мкл фермента с активностью 20 ед./мкл достаточно для 100 пмолей олигонуклеотида.
- Реакцию можно проводить в течение ночи без ухудшения результата.
- Не останавливайте реакцию путем добавления фенола или хлороформа, так как короткие олигонуклеотиды могут переходить в органическую фазу.

### Очень важно !

Перед использованием меченого зонда обязательно удалите не включившиеся нуклеотиды, содержащие биотиновую или флуоресцеиновую метку. Для удаления не включившихся нуклеотидов можно использовать два способа:

- Колонка** с *Sephadex G-100*, *Sephadex G-50* или *Sephacryl S-400*. Этот способ подходит для очистки зондов длиной более 1000 пар оснований.
- Переосаждение с гликогеном**. Подходит для любых, даже самых коротких зондов.