

## Использование биотин-11-dUTP и флуоресцеин-12-dUTP для нерадиоактивного мечения ДНК

Использование нерадиоактивной метки для получения меченых проб имеет свои плюсы и минусы. Основным недостатком нерадиоактивных проб может является их более низкая чувствительность в некоторых методиках по сравнению с радиоактивно мечеными пробами. Основным преимуществом биотинилированных проб является их долговечность - полученные пробы, меченые модифицированным основанием, в отличие от проб, полученных с использованием радиоактивной метки, можно хранить как минимум в течении года при температуре -20 °С - -70 °С. Использование одной и той же пробы делает результаты воспроизводимыми и сопоставимыми в течении всего срока работы.

Включение нерадиоактивной метки в ДНК возможно двумя основными способами:  
- с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и  
- с использованием случайных гексануклеотидных затравок (рендом праймирование).

### ПЦР с использованием нерадиоактивной метки

Получение проб для гибридизации методом ПЦР является эффективным и хорошо воспроизводимым методом. Значительные количества специфической пробы можно получить в течении короткого времени, часто, это требует не больше одного часа, используя в качестве исходной матрицы минимальные количества плазмиды или даже геномную ДНК. При таком подходе требуется существенно меньше исходного материала, а чистота такого материала практически не имеет значения, что, наоборот, очень важно при мечении в системе рендом праймирования.

Включение нерадиоактивной метки в ходе ПЦР позволяет также непосредственно определять продукт ПЦР в случаях, когда выход продукта низкий и не может быть выявлен в геле окрашиванием этидиум бромидом.

### Влияние модифицированного основания на выход продукта в ходе ПЦР

Боковая цепь с биотином или флуоресцеином, присоединенная к dUTP, в основном не препятствует различным полимеразам включать модифицированное основание в синтезируемую цепь ДНК. Однако, есть некоторые особенности, с которыми приходится встречаться при работе с модифицированными основаниями.

### Количество модифицированного основания, требуемое для получения пробы с высоким удельным включением

Проба для гибридизации должна иметь высокое удельное включение. Поэтому, желательно, чтобы количество биотин-11-dUTP или флуоресцеин-12-dUTP в смеси с дезокситрифосфатами было максимально. Однако, если полностью заменить dTTP на модифицированное основание в смеси, то выход продукта критически уменьшается. Для выяснения оптимального соотношения мы проверяли смеси, имеющие соотношения био-11-dUTP:dTTP 1:2, 1:3 и 1:10.

В наших экспериментах наибольшее удельное включение, как и следовало ожидать, мы получили при соотношении смеси био-11-dUTP:dTTP 1:2. Почти такое же удельное включение было получено при использовании смеси 1:3. Удельное включение с использованием смеси 1:10 было очень низким.

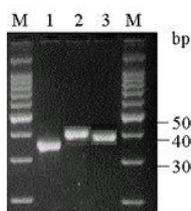
Исходя из полученных результатов, мы считаем наиболее оптимальным использование смеси 1:3. Это имеет свои оправдания и с экономической и с практической точек зрения.

Все вышесказанное относится и к флуоресцеин-12-dUTP.

## Влияние включения модифицированного основания на выход продукта ПЦР и его подвижность в агарозном геле на примере биотин-11-dUTP

Анализируя продукты ПЦР, меченые с помощью био-11-dUTP, мы получили следующие результаты:

- использование био-11-dUTP при мечении влияет на выход конечного продукта. Как правило, выход конечного продукта меньше, если сравнивать с ПЦР, где были использованы обычные дезокситрифосфаты.
- продукты с включенным био-11-dUTP имели меньшую электрофоретическую подвижность в агарозном геле, чем продукты ПЦР, полученные при помощи обычных дезокситрифосфатов.
- разные термостабильные полимеразы (*Taq*, *Tth*, *Pfu*) по-разному включают био-11-dUTP в синтезируемую ДНК. Если *Taq*- и *Tth*-полимераза включают приблизительно с одинаковой эффективностью, то *Pfu*-полимераза включает био-11-dUTP почти в 30 раз более эффективно, чем *Taq*-полимераза и *Tth*-полимераза. При этом, выход конечного продукта в ходе ПЦР у всех трех полимераз практически один и тот же.



На приведенном снимке видно, что подвижность продукта, полученного с помощью *Pfu*-полимеразы наименьшая. Это показывает более высокую эффективность включения.

Результаты дота серийных 10-кратных разведений с последующей конъюгацией со стрептавидин-щелочная фосфатаза и визуализацией при помощи BCIP/NBT показали (снимок дота не приводится), что удельное включение био-11-dUTP в продукт увеличивается на порядок.

**Рис.1. Эффект включения био-11-dUTP в ПЦР продукт**

Продукты ПЦР анализировали в 2%-ом агарозном геле с этидиумом бромидом.

М - маркер длин фрагментов,

1 - "стандартный" ПЦР продукт,

2 - *Pfu* биотин меченый ПЦР продукт,

3 - *Taq* биотин меченый ПЦР продукт

## Протокол постановки ПЦР с модифицированным основанием

Данный протокол описывает получение биотин или флуоресцеин меченой пробы методом ПЦР с использованием смеси **биотин-11-dUTP 1/3** (150 мкМ dATP, dCTP, dGTP, 100 мкМ dTTP, 50 мкМ биотин-11-dUTP) или **флуоресцеин-12-dUTP 1/3** (150 мкМ dATP, dCTP, dGTP, 100 мкМ dTTP, 50 мкМ флуоресцеин-12-dUTP), предлагаемой НПАО "СИЛЕКС М".

👉 Использование смеси с пропорционально более высокой концентрацией дезокситрифосфатов может давать лучшие результаты, но стоимость такой смеси будет более высокой.

Для постановки реакции смешайте в пробирке следующие компоненты:

- 4.0 мкл смеси **Биотин-11-dUTP 1/3** или **флуоресцеин-12-dUTP 1/3**,
- 2.5 мкл *Taq*-буфера (x10),
- по 1 мкл праймеров до конечной концентрации каждого праймера 0.1-1 мкМ,
- *Taq*-полимераза, 0.5-2.5 ед./25 мкл смеси,
- матричная ДНК, 0.02-0.15 мкг/25 мкл смеси,
- деионизированная вода до 25 мкл,
- 25 мкл минерального масла (масло должно полностью покрыть водный раствор во избежании испарения реакционной смеси в ходе реакции. В добавлении масла нет необходимости, если используется прибор с нагреваемой крышкой, препятствующей испарению реакционной смеси в ходе реакции).

Установите следующий амплификационный цикл:

94 °С	- 10 сек;
37-68 °С	- 10 сек;
72 °С	- 10-60 сек (в зависимости от длины получаемого продукта);

количество циклов - 40.

Время инкубации после последнего цикла - 72 °С - 3 мин.

Поскольку условия ПЦР определяются прибором, в котором проводят амплификацию, праймерами и матричной ДНК, конкретные условия реакции и время каждого этапа часто приходится подбирать экспериментально.

После проведения реакции, на время предварительного анализа, амплификат рекомендуем хранить при +4 °С, лучше при -20 °С, еще лучше - при -70 °С.

После проведения ПЦР проанализируйте небольшую аликвоту реакционной смеси (прибл. 3-5 мкл) в агарозном геле с этидиумом бромидом. Если полученный продукт предполагается использовать в качестве гибридационной пробы в геномном блоте, в геле должна быть видна только одна единственная полоса продукта (необходимо помнить, что меченый биотином продукт будет иметь меньшую электрофоретическую подвижность по сравнению с аналогичным немеченым продуктом).

Если продукт амплификации, видимый в геле, имеет неспецифические полосы, то использование такой меченой пробы создаст значительные трудности на стадии интерпретации результатов гибридизации.

# Использование биотин-11-dUTP и флуоресцеин-12-dUTP в реакции мечения ДНК гексануклеотидными праймерами

## Набор «Нерадиоактивное мечение ДНК (Био-Рендомпрайм)», версии: фрагмент Кленова / Термостабильная полимераз

Набор предназначен для мечения ДНК с использованием биотин-11-dUTP или флуоресцеин-12-dUTP. Синтез комплементарной цепи проводят на денатурированной матричной ДНК, начиная с 3'-конца олигонуклеотидной затравки, при помощи ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова или термостабильная полимераз).

### Состав набора:

1. Реакционный буфер ( x 10 );
2. Смесь dNTP с биотин-11-dUTP или флуоресцеин-12-dUTP;
3. ДНК-полимераз (фрагмент Кленова или термостабильная полимераз);
4. Гексануклеотидная затравка (Random Primer).

Количество реакций - **50**

Условия хранения набора: **-20 °C**

### **Стандартная методика для проведения реакции мечения**

Используя этот набор Вы можете пометить от 10 нг до 3 мкг ДНК в одной стандартной реакции. Однако, для получения наиболее удельно меченого продукта мы рекомендуем брать в одну реакцию мечения 50-100 нг ДНК. Если требуется получить большие количества меченого материала, то количества всех добавляемых компонентов должны быть пропорционально увеличены.

Для получения хороших результатов ДНК должна быть хорошо очищена. Для получения чистой ДНК мы рекомендуем наборы для выделения на магнитных частицах, выпускаемые нашей фирмой.

**1.** В пробирку типа *Eppendorf* внесите следующие компоненты в указанном порядке:

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| - матричная ДНК (50-100 нг)  | 5.0 мкл |
| - реакционный буфер (x10)    | 2.5 мкл |
| - гексануклеотидная затравка | 2.5 мкл |
| - деионизированная вода      | 6.0 мкл |

Встряхните пробирку на вортексе и соберите капли центрифугированием.

**2.** Инкубируйте пробу 5-10 мин в кипящей водяной бане для денатурации ДНК и затем быстро перенесите пробирку в лед. Соберите капли центрифугированием.

**3.** Добавьте к пробе следующие компоненты:

- |   |         |
|---|---------|
| - смесь dNTP с биотин-11-dUTP или флуоресцеин-12-dUTP | 8.0 мкл |
| - ДНК-полимеразу: фрагмент Кленова                    | 1.0 мкл |
| или термостабильная полимераз                         | 0.5 мкл |

**4.** Инкубируйте пробу в течении часа при **37 °C** при использовании фрагмента Кленова или при **45 °C** при использовании термостабильной полимеразы.

**5.** Остановите реакцию добавлением 1 мкл 0.5 М ЭДТА pH 8.0.

6. Полученную меченую ДНК используйте сразу или храните при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Еще лучше переосадить меченую ДНК. Для этого к реакционной смеси (25 мкл) добавьте 8 мкл 7 М ацетата аммония, 100 мкл этанола, хорошо перемешайте и оставьте минимум на 30 мин при  $-70^{\circ}\text{C}$  или на 2 часа при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Отцентрифугируйте при 12000 об/мин в течении 10 мин, промойте осадок холодным 70%-ным этанолом, высушите под вакуумом и растворите в подходящем объеме воды или ТЕ буфера.

👉 Повысить включение меченого основания можно, оставляя реакционную смесь для инкубации на ночь при  $37^{\circ}\text{C}$  или при комнатной температуре ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ). Инкубация при комнатной температуре продлевает жизнь фермента (фрагмента Кленова) и делает включение более эффективным.

Следует помнить, что количество синтезированной меченой ДНК зависит не только от чистоты, но и от количества взятой в реакцию матричной ДНК.

Что касается использования термостабильной полимеразы, то добиться большего выхода меченого продукта можно повторив процедуру денатурация-отжиг-ферментативная реакция. Для этого после стадии 4 в выше приведенной методике переходите к стадии 2.

**Таблица 1.** Количество синтезированной меченой ДНК в зависимости от количества матричной ДНК, взятой в реакцию (по данным *Boehringer Mannheim GmbH*)

Количество матричной ДНК в реакционной смеси	10 нг	30 нг	100 нг	300 нг	1000 нг	3000 нг
Количество синтезированной меченой ДНК	10 нг	30 нг	60 нг	120 нг	260 нг	530 нг

## Выявление ДНК, меченых флуоресцеин-12-dUTP

Продукты, полученные в результате мечения с использованием флуоресцеин-12-dUTP, и/или результаты гибридизации этих продуктов с нуклеиновыми кислотами можно выявить следующими способами:

- флуоресценция меченого продукта. Длина волны возбуждения – **495 нм**, длина волны излучения – **525 нм** (зеленая флуоресценция). Применимо для блотов, дотов, гибридизации в растворе, гибридизации *in situ*, продуктов секвенирования.
- путем не прямой реакции с использованием антител к флуоресцеину с образованием:
  - нерастворимого окрашенного продукта (применимо для блотов, дотов, гибридизации *in situ*),
  - растворимого окрашенного продукта (применимо для гибридизации в растворах).

В настоящий момент наша фирма не предлагает реактивы на основе антител к флуоресцеину.

## Выявление ДНК, меченых биотин-11-dUTP

Продукты, полученные в результате мечения с использованием биотин-11-dUTP, и/или результаты гибридизации этих продуктов с нуклеиновыми кислотами можно выявить путем не прямой реакции с образованием:

- нерастворимого окрашенного продукта (применимо для блотов, дотов, гибридизации *in situ*),
- растворимого окрашенного продукта (применимо для гибридизации в растворах).

Ниже мы приводим протокол выявления меченых ДНК с образованием нерастворимого окрашенного продукта с использованием набора, выпускаемым нашей фирмой.

## Набор «Нерадиоактивное определение ДНК, меченой биотином»

Набор предназначен для выявления ДНК методом связывания биотина конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза с последующей цветной реакцией с 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфатом (BCIP) и нитроглубым тетразолием (NBT), осуществляемой щелочной фосфатазой, с образованием темно-синего нерастворимого осадка.

Набор позволяет выявлять от 1 пг гомологичной ДНК. Для выявления единичной копии гена требуется от 5 мкг хромосомальной ДНК млекопитающих. По сравнению с радиоактивной системой детекции, данная система дает сопоставимые результаты за более короткий промежуток времени и позволяет стандартизовать результат за счет использования одного и того же меченого зонда, способного храниться в течении, как минимум, одного года. Метод нерадиоактивного определения ДНК применим для всех случаев, где обычно используют радиоактивное мечение и детекцию (блот- Саузерн-гибридизации, гибридизации колоний, блюшек и *in situ* гибридизация).

### Состав набора:

1. Буфер #1 (x10) для промывки фильтра после гибридизации
2. Блокирующий реагент
3. Конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза
4. Буфер #2 (x10) для проведения ферментативной реакции
5. Субстрат ST#1 (NBT)
6. Субстрат ST#2 (BCIP)

Набор предназначен для окрашивания фильтров общей площадью 100 см<sup>2</sup>.

Условия хранения набора: +4 °С

### ☞ ВНИМАНИЕ !!!

Перед началом работы рассчитайте необходимые количества растворов и реактивов, которые будут использованы для окрашивания конкретного фильтра.

Приготовьте необходимые x1-ные буфера из x10-ных.

**Блокирующий буфер:** блокирующий реагент - 2% в буфере #1 (x1).

**Красящий раствор** (готовится непосредственно перед применением): 7 мкл ST#1 и 3.5 мкл ST#2 в 1 мл буфера #2 (x1).

### Проведение процедуры окрашивания

☞ Все описываемые в протоколе работы проводятся при комнатной температуре (22±3 °С).

Данная процедура предусмотрена для фильтра с заранее отгибризованным биотинилированным зондом. Процедура гибридизации в данном протоколе не рассматривается.

1. Промойте фильтр в течении 1 мин в Буфере #1.
2. Проинкубируйте фильтр в течении 30 мин в *блокирующий буфере* (0.1 мл на 1 см<sup>2</sup> фильтра).
3. Промойте фильтр в Буфере #1.
4. Разведите конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза в Буфере #1 до разведения 1:3000 (0.1 мл на 1 см<sup>2</sup> фильтра). Разведенный конъюгат стабилен при +4 °С около 12 часов.
5. Проинкубируйте фильтр в течении 30 мин в соответствующем объеме разведенного конъюгата.
6. Удалите несвязавшийся конъюгат, промывая фильтр 2 раза по 15 мин Буфером #1.

7. Проинкубируйте фильтр в Буфером #2 в течении 2 мин.

8. Инкубируйте фильтр в соответствующем объеме *красящего раствора* (0.1 мл на 1 см<sup>2</sup> фильтра). Для экономии раствора инкубацию рекомендуется проводить в полиэтиленовом пакете, подобранному по размеру фильтра. Инкубацию проводите в темном месте, что уменьшает образование фона. Образование окраски может начаться через несколько минут, но обычно реакция занимает от 30 мин до 3 часов в зависимости от количества меченой пробы (можно для ускорения образования окраски помещать фильтр на +37 °С, хотя это может приводить к усилению фона).

9. Для прекращения реакции ополосните фильтр дистиллированной водой.

10. Результат рекомендуется задокументировать путем фотографирования фильтра, его ксерокопированием, введением в компьютер с помощью видеокамеры или сканера.

11. После документирования фильтр можно высушить и затем хранить при комнатной температуре. При высушивании окраска полос ослабевает.

## Возможные трудности

### Проблемы с чувствительностью

Если Вам не удастся получить нужную чувствительность, проверьте:

- эффективность мечения ДНК пробы;
- концентрацию меченой ДНК.

Для повышения чувствительности можно:

- увеличить время инкубации при гибридизации с меченой ДНК пробой;
- увеличить время реакции с красящим раствором до 1 суток;
- приготовить разведение конъюгата 1:1000 (см. п.4).

### Проблемы с фоном

Если у Вас получается сильно окрашенный фон на фильтре, то:

- уменьшите количество меченой ДНК пробы при гибридизации;
- увеличьте объем буфера при предгибридации, чтобы фильтр мог бы свободно плавать и тем самым уменьшилась бы опасность подсыхания фильтра;
- попробуйте другие виды фильтров;
- попробуйте использовать более сильное разведение конъюгата.

**Таблица 1:** Чувствительность выявления блотированного продукта в зависимости от концентрации меченой ДНК используемой для гибридизации и времени реакции окрашивания (по данным *Boehringer Mannheim GmbH*).

Концентрация меченой ДНК (нг/мл)	0.5	2	5	10	20	30	50
Чувствительность (пг) цветной реакции через							
1 час	-	10	5	2	1	1	0.5
3 часа	10	2	1	0.5	0.5	0.5	0.2
12 часов	2	0.5	0.2	0.1	0.1	0.05	0.05