



New enzymes  
for DNA technologies

**SibEnzyme**

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Набор для Glal-ПЦР анализа

Каталожные номера K011S, K011L

#### Ключевая информация

- Набор предназначен для определения статуса метилирования фрагмента ДНК человека и млекопитающих с помощью ПЦР в реальном времени и выявления в нем неметилированных сайтов RCGY.
- При наличии в изучаемом фрагменте ДНК одного сайта RCGY набор позволяет определить концентрацию молекул ДНК с этим неметилированным сайтом и его процентное содержание по отношению к общему количеству молекул с данным фрагментом.
- Для Glal-ПЦР анализа должны быть подобраны праймеры и зонд, соответствующие структуре определяемого фрагмента ДНК с одним (или более) сайтом RCGY.
- Glal-ПЦР анализ проводится за 3-4 часа и включает 2 этапа: гидролиз ДНК и ПЦР в реальном времени.
- **НЕ ТРЕБУЕТ БИСУЛЬФИТНОЙ КОНВЕРСИИ ДНК**

#### Оглавление

Состав набора .....	2
Описание метода.....	3
Протокол проведения Glal-ПЦР-анализа .....	4
Приложение 1: Протокол определения доли неметилированного сайта ACGC в регуляторной области гена RARb [3] .....	6
Список литературы .....	11
Информация для заказа.....	12
Услуги.....	12

#### Адрес в интернет

<http://russia.sibenzyme.com/products/sets>



## Состав набора

Набор для GLAI-ПЦР анализа		K011S 200 р-ций	K011L 1000 р-ций
1	1X TE буфер	200 мкл	1 мл
2	10X SE TMN буфер	150 мкл	750 мкл
3	BCA, 10 мг/мл	70 мкл	350 мкл
4	MD ДНК-эндонуклеаза (20 е.а./мкл)	30 мкл	90 мкл
5	$\beta$ -меркаптоэтанол (200мМ)	12 мкл	60 мкл
6	10X SE GLAD буфер	430 мкл	2200 мкл
7	Смесь четырех dNTP, 10 мМ каждый	90 мкл	450 мкл
8	SP Taq ДНК Полимераза, 5 е.а./мкл	80 мкл	400 мкл
9	Контрольная ДНК L68, 18 нг/мкл	10 мкл	50 мкл
10	Контрольная ДНК HeLa, 18 нг/мкл	10мкл	50 мкл
11	Контрольная ДНК мыши, 18 нг/мкл	25 мкл	125 мкл
12	ДНК фага $\lambda$ , 18 нг/мкл	10 мкл	50 мкл
13	ДНК Raji, 18 нг/мкл	15 мкл	75 мкл
14	Контрольная смесь RARb (праймеры и флуоресцентный зонд), 10 $\mu$ M каждый	40 мкл	200 мкл

Срок годности реагентов в составе набора – 1 год с даты производства. Условия хранения: **-20°C**

Все партии реагентов проходят контроль качества, с сохранением контрольного образца.

Набор для Glai-ПЦР анализа содержит все реагенты, необходимые для проведения Glai-ПЦР анализа за исключением праймеров и флуоресцентно-меченных зондов. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов должны соответствовать структуре изучаемого фрагмента ДНК, содержащего один или несколько сайтов RCGY.

Смеси праймеров и зонда для Glai-ПЦР анализа фрагмента ДНК человека приложены для демонстрации возможностей применения метода.

Контрольная смесь RARb (праймеры и флуоресцентный зонд) предназначена для анализа фрагмента ДНК в 3-й хромосоме, в регуляторной области гена RARb (позиция 25428290 – 25428403 в соответствии с геномной сборкой GRCh38/hg38).

## Описание метода

На сегодняшний день для начальных стадий ряда заболеваний (таких как онкологические заболевания, ишемическая болезнь сердца, диабет и пр.) было показано наличие aberrантного (аномального) метилирования регуляторных областей значительного числа генов.

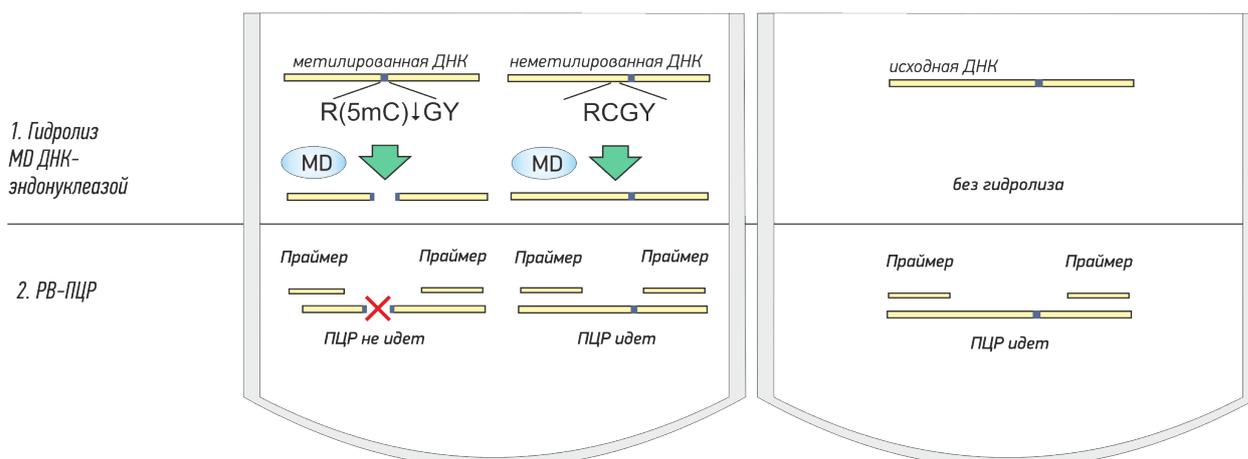
Такое aberrантное метилирование регуляторных областей генов *de novo* осуществляется ДНК метилтрансферазами DNMT3A и DNMT3B, которые узнают и метилируют сайт 5'-RCGY-3' с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5'[1].

Сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза (MD ДНК-эндонуклеаза), входящая в набор, узнает и расщепляет именно эту последовательность 5'-R(5mC)↑GY-3'/3'-YG↑(5mC)R-5' с образованием тупых концов как указано стрелками [2].

GlaI-ПЦР анализ основан на использовании MD ДНК-эндонуклеазы и позволяет определять статус метилирования анализируемого фрагмента ДНК, содержащего один или несколько сайтов RCGY. GlaI-ПЦР анализ проводится в два этапа: а) гидролиз анализируемого образца ДНК MD ДНК-эндонуклеазой, б) ПЦР в реальном времени с праймерами, окаймляющих изучаемый фрагмент [3].



### GlaI-ПЦР



При наличии в анализируемом фрагменте ДНК сайта R(5mC)GY, MD ДНК-эндонуклеаза его расщепляет и при последующей ПЦР не происходит образование продукта. В тоже время, при ПЦР контрольного образца (где не было гидролиза ферментом) происходит образование ПЦР-продукта. Сравнение результатов ПЦР контрольного образца и ДНК после гидролиза ферментом позволяет определить статус метилирования изучаемого фрагмента ДНК.

При наличии одного сайта RCGY в изучаемом фрагменте ДНК метод GlaI-ПЦР анализа позволяет определить концентрацию неметилированного сайта и рассчитать его процентное содержание по отношению к общему количеству молекул ДНК с данным фрагментом.

В сравнении с другими методами определения метилирования ДНК GlaI-ПЦР анализ имеет ряд преимуществ:

- Простота – 2 несложных последовательных этапа
- Скорость проведения – всего 3-4 часа
- Для анализа требуется только стандартное лабораторное оборудование и термоциклер для ПЦР.

# Протокол проведения Glal-ПЦР-анализа

для определения доли метилированного сайта RCGY в образцах ДНК.

## Подготовка праймеров и зондов

Геномные праймеры и флюоресцентный зонд для фрагмента ДНК, содержащего минимум один сайт RCGY подбираются как обычно [3].

Протокол ПЦР рассчитан на GC-состав фрагмента не выше 68-69%.

Исследование каждого образца проводится в двух ПЦР: исходной и гидролизованной ДНК в трех повторах (триплетах) каждая, – всего 6 реакций/2 триплета на образец.

Смесь праймеров (2.4 мкл на 1 триплет) включает 2 геномных праймера, а также флюоресцентный зонд в концентрациях 10мкМ каждый.



## Подготовка ДНК

1. Подготовьте раствор исследуемых ДНК в H<sub>2</sub>O (Если Вы планируете хранить раствор исследуемых ДНК, используйте вместо воды 1X TE буфер). Концентрация исследуемых ДНК, определяемая спектрофотометрически, должна быть в диапазоне 6 нг/мкл - 30 нг/мкл. Здесь и далее используйте деионизованную (Milli-Q) H<sub>2</sub>O.

## Подготовка ДНК-стандартов

2. Подготовьте 5 пробирок с ДНК-стандартами и одну контрольную:

Внесите в пробирку №1 26 мкл H<sub>2</sub>O, в пробирки №2, №3, №4, №5 – по 15 мкл H<sub>2</sub>O, в пробирку №6 – 13,5 мкл H<sub>2</sub>O.

В пробирку №1 добавьте 4 мкл раствора ДНК Raji (из линии клеток лимфомы Беркитта) в концентрации 18 нг/мкл. Аккуратно перемешайте.

В пробирку №2 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №1, аккуратно перемешайте.

В пробирку №3 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №2, аккуратно перемешайте.

В пробирку №4 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №3, аккуратно перемешайте.

В пробирку №5 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №4, аккуратно перемешайте.

Удалите 15 мкл смеси из пробирки №5.

В пробирку №6 добавьте 1,5 мкл раствора ДНК мыши (отрицательный контроль) в концентрации 18 нг/мкл. Аккуратно перемешайте. Сбросьте капли центрифугированием.

## Этап 1: гидролиз ДНК MD ДНК-эндонуклеазой

3. Подготовьте пробирки для ПЦР (200 мкл) по 2 шт. на каждый анализируемый образец. Смешайте 13,5 мкл H<sub>2</sub>O и 1,5 мкл ДНК образца в каждой пробирке таким образом, чтобы получилось по 2 пробирки на каждый анализируемый образец под номером N (подпишите их «No» - опыт, и «Nk» - контроль).

4. Подготовьте общую реакционную смесь на количество пробирок, равное 2N образцов + 6 стандартов. Реакционная смесь готовится из расчета на один триплет: 12.37 мкл H<sub>2</sub>O + 3.15мкл 10X SE TMN буфера + 0.32 мкл БСА + 0,04 мкл ДНК фага лямбда(18нг/мкл) + 0.17 мкл β-меркаптоэтанола (200мМ). После добавления каждого следующего реагента аккуратно перемешайте содержимое пробирки.

5. Добавьте по 15.2 мкл полученной реакционной смеси в каждую из пробирок с номерами Nk и в пробирки со стандартами под номерами 1-6, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.

6. К оставшемуся объему реакционной смеси добавьте MD ДНК-эндонуклеазу (20ед/мкл) из расчета 0,19 мкл на триплет. Добавьте по 15.2 мкл полученной реакционной смеси в каждую из пробирок с номерами No, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.

Рекомендуемый минимальный объем реакционной смеси рассчитывается на 12 триплетов (если число триплетов в эксперименте меньше 12, то остаток реакционной смеси не используется).

7. Инкубируйте все пробирки 40 минут при температуре 37 °С, по окончании инкубации сбросьте капли центрифугированием.

## Этап 2: ПЦР в реальном времени

8. Подготовьте ПЦР Смесь из расчета на один триплет 20.8 мкл H<sub>2</sub>O + 6.3 мкл 10X SE GLAD буфер + 1.2 мкл смеси трифосфатов + 0.6 мкл БСА + 2.4 мкл Смеси праймеров для исследуемого фрагмента ДНК + 0.4 мкл SP Taq ДНК полимеразы. После добавления каждого следующего реагента аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.

9. Добавьте по 30.2 мкл Смеси для ПЦР во все пробирки с ДНК, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.

10. Перенесите по 20 мкл реакционной смеси из каждой пробирки в три лунки на ПЦР планшете, заклейте оптически прозрачной плёнкой для запечатывания планшетов, отцентрифугируйте, поместите в термоциклер.

11. Проведите ПЦР в реальном времени по профилю термоциклирования, подходящего для данного фрагмента ДНК с учетом особенностей Вашего термоциклера.

## Анализ результатов

Для каждого образца после анализа будут получены два результата: концентрация фрагмента ДНК в контроле и концентрация метилированного сайта RCGY в опыте. Соотношение данных значений позволяет определить процент метилированного сайта в препарате ДНК.

## Приложение 1: Протокол определения доли неметилированного сайта ACGC в регуляторной области гена RARb [3]

Ниже приведен протокол Glal-ПЦР анализа для определения доли неметилированного сайта ACGC в регуляторной области гена RARb. Эксперимент проводится с использованием 2 контрольных ДНК: ДНК L68 (из линии диплоидных клеток легкого эмбриона человека) и ДНК HeLa (из клеточной линии аденокарциномы шейки матки).

1. Подготовьте 4 реакционных пробирки (на 200 мкл) и подпишите их Hk, Ho, Lk и Lo. Смешайте 13.5 мкл H<sub>2</sub>O и 1.5 мкл ДНК в каждой пробирке (пробирки Hk и Ho - ДНК HeLa; Lk и Lo – L68 ДНК).
2. Подготовьте 5 пробирок с «точками калибровки» и одну контрольную: Внесите в пробирку №1 26 мкл H<sub>2</sub>O, в пробирки №2, №3, №4, №5 – по 15 мкл H<sub>2</sub>O, в пробирку №6 – 13,5 мкл H<sub>2</sub>O.  
В пробирку №1 добавьте 4 мкл раствора ДНК Raji в концентрации 18 нг/мкл. Аккуратно перемешайте.  
В пробирку №2 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №1, аккуратно перемешайте.  
В пробирку №3 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №2, аккуратно перемешайте.  
В пробирку №4 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №3, аккуратно перемешайте.  
В пробирку №5 – перенесите 15 мкл раствора ДНК из пробирки №4, аккуратно перемешайте. Удалите 15 мкл смеси из пробирки №5.  
В пробирку №6 добавьте 1,5 мкл раствора ДНК мыши (отрицательный контроль) в концентрации 18 нг/мкл. Аккуратно перемешайте. Сбросьте капли центрифугированием.
3. Подготовьте общую реакционную смесь А для 10 пробирок (Hk, Ho, Lk, Lo и 6-ти стандартов): 149 мкл H<sub>2</sub>O + 37.8мкл 10X SE TMN буфера + 3.8 мкл БСА + 0,5 мкл ДНК фага лямбда(18нг/мкл) + 1.9 мкл β-меркаптоэтанола (200мМ). После добавления каждого следующего реагента аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.
4. Добавьте по 15.2 мкл реакционной смеси А в пробирки Hk, Lk и 6 стандартов, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.
5. Из оставшегося объема реакционной смеси отберите 30.4 мкл в отдельную пробирку и добавьте туда же 0.4 мкл MD ДНК-эндонуклеазы (20ед/мкл), аккуратно перемешайте пипетированием.
6. Добавьте по 15.2 мкл полученной реакционной смеси в пробирки Ho и Lo, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.
7. Инкубируйте все пробирки 40 минут при температуре 37 °С
8. Подготовьте ПЦР Смесь: 208 мкл H<sub>2</sub>O + 63 мкл 10X SE GLAD буфер + 12 мкл смеси трифосфатов + 6 мкл БСА + 24 мкл Смеси «RARb» праймеров и зонда + 4 мкл SP Taq ДНК полимеразы. После добавления каждого следующего реагента аккуратно перемешивайте содержимое пробирки, затем сбросьте капли центрифугированием.
9. Добавьте по 30 мкл ПЦР Смеси в пробирки с ДНК, аккуратно перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.

10. Перенесите по 20 мкл реакционной смеси из каждой пробирки в три лунки на ПЦР

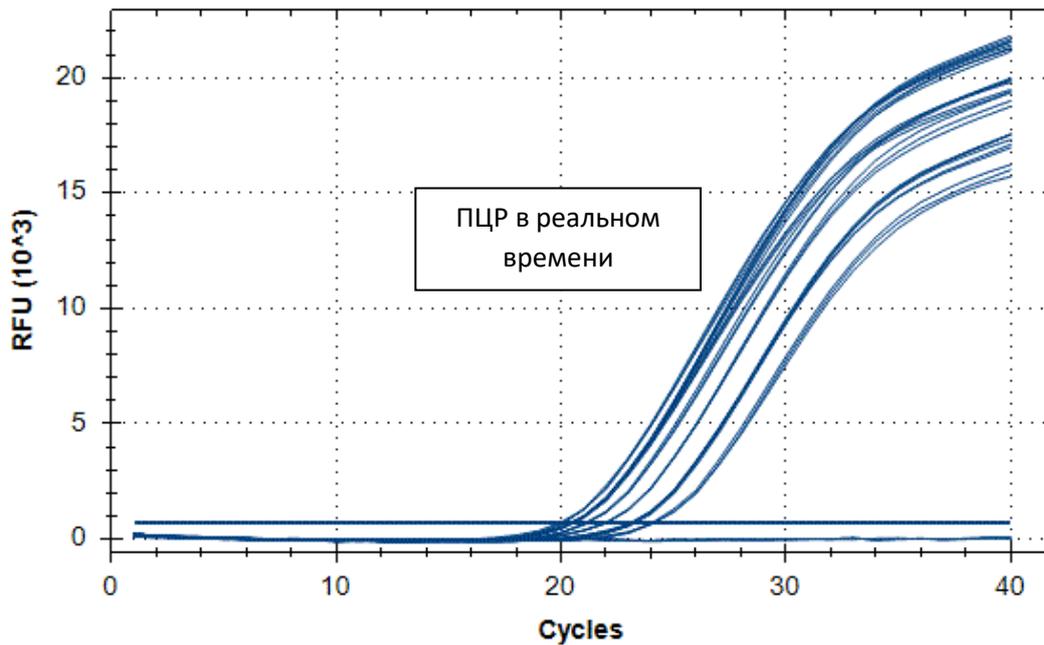
планшете, заклейте оптически прозрачной плёнкой для запечатывания планшетов, отцентрифугируйте, поместите в термоциклер.

Проведите ПЦР в реальном времени по следующей схеме: 3 мин при 95°C; 5 «слепых» циклов: 95°C — 10 сек; 65°C — 20 сек; 72°C — 10 сек; 40 циклов: 95°C — 10 сек; 65°C — 20 сек (с детекцией флуоресцентного сигнала в канале FAM); 72°C — 10 сек. Указанный профиль термоциклирования является одним из возможных и может меняться в зависимости от типа термоциклера.

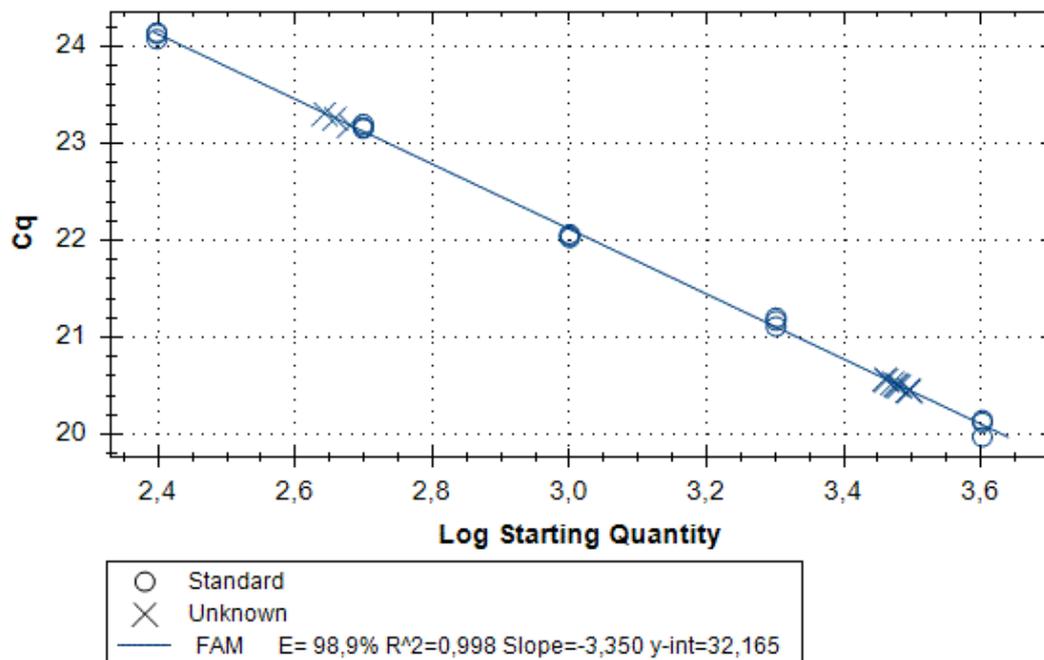
Ниже представлены полученные кривые роста флуоресценции по мере увеличения числа циклов ПЦР (рис.1), графики зависимости величины  $C_q$  от концентрации ДНК стандартов (-o-) с отмеченными величинами  $C_q$  для ДНК HeLa и L-68 (-x-) (рис.2), отдельно вынесенные кривые роста флуоресценции для ДНК HeLa (рис.3), ДНК L-68 (рис.4) и стандартов ДНК (рис.5).

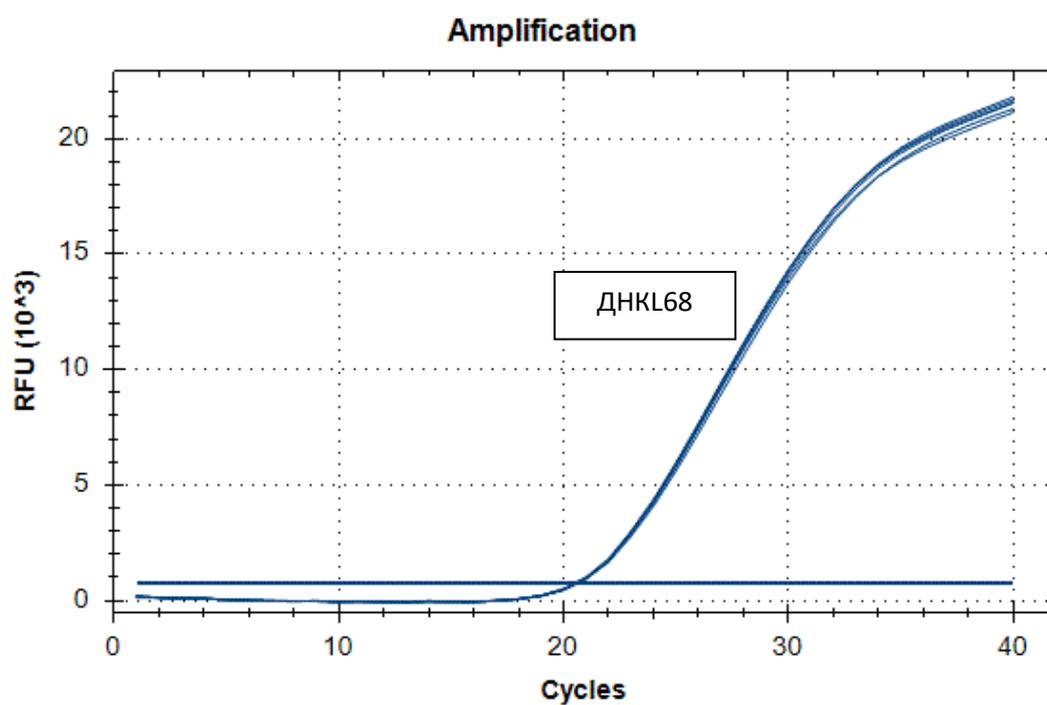
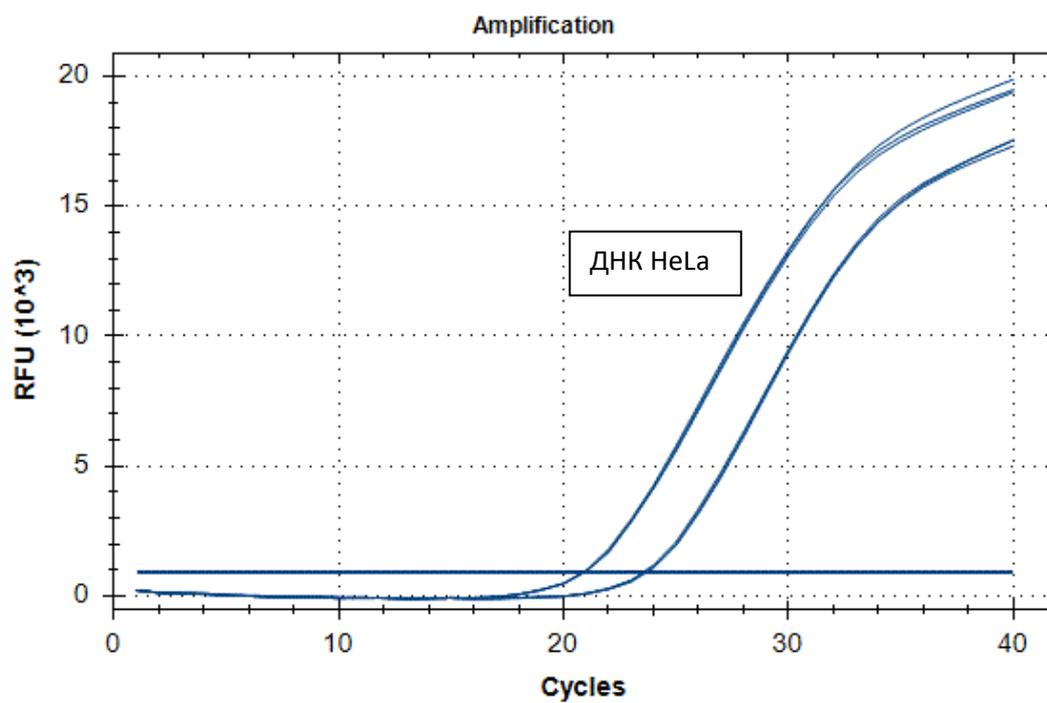
Полученные результаты суммированы в Таблице 1. Как видно из данных, представленных в таблице, концентрация фрагмента ДНК гена RARb приблизительно одинаковая в пробах Lk, Lo, Hk и составляет около 3000 копий в каждой точке триплета. В тоже время в пробах Ho концентрация ДНК около 460 копий, что составляет 15%. Таким образом, сайт ACGC в гене RARb в ДНК L-68 метилирован незначительно (около 5%), тогда как в ДНК HeLa он метилирован на 85%.

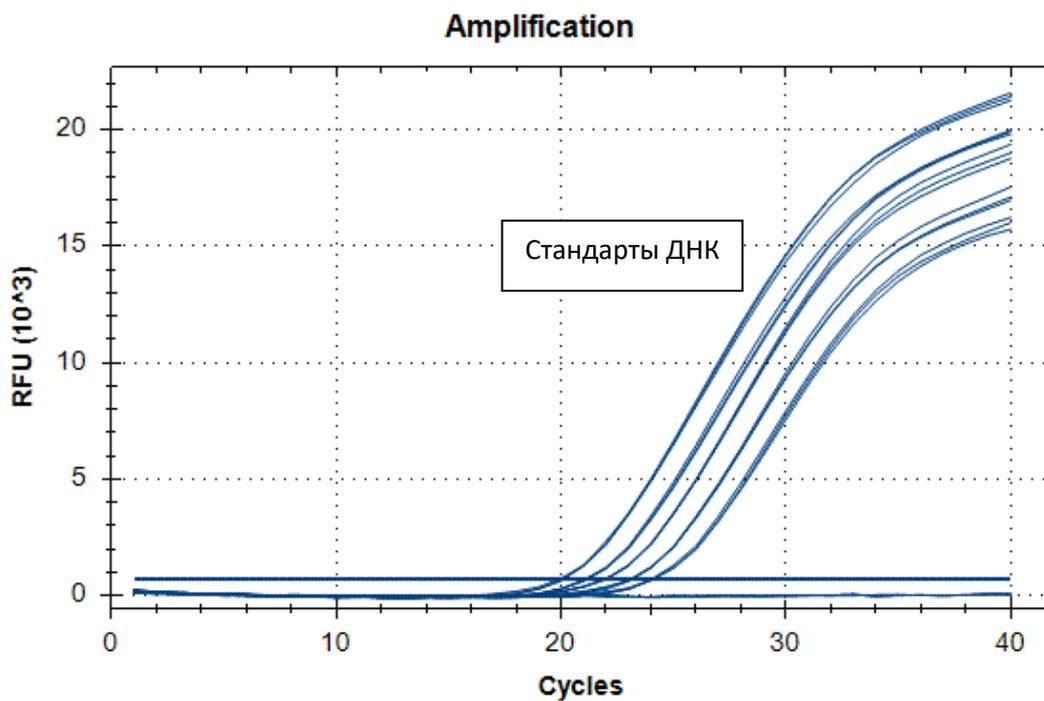
### Amplification



### Standard Curve







Target	Sample	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev
RARb	Ho	4,395E+02	4,58E+02	1,95E+01
RARb	Ho	4,549E+02	4,58E+02	1,95E+01
RARb	Ho	4,782E+02	4,58E+02	1,95E+01
RARb	Hk	3,127E+03	3,06E+03	5,99E+01
RARb	Hk	3,032E+03	3,06E+03	5,99E+01
RARb	Hk	3,016E+03	3,06E+03	5,99E+01
RARb	Lo	2,902E+03	2,92E+03	4,12E+01
RARb	Lo	2,965E+03	2,92E+03	4,12E+01
RARb	Lo	2,887E+03	2,92E+03	4,12E+01
RARb	Lk	2,997E+03	3,09E+03	7,78E+01
RARb	Lk	3,128E+03	3,09E+03	7,78E+01
RARb	Lk	3,135E+03	3,09E+03	7,78E+01

## Список литературы

1. Handa, V., and Jeltsch A. "Profound sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome" // 2005, J. Mol. Biol. 348, 1103-1112
2. Tarasova G. V., Nayakshina T. N., Degtyarev S. Kh. [Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal.](#) // BMC Molecular Biology 2008, 9:7
3. *EV Dubinin, AG Akishev, MA Abdurashitov, SB Oleynikova, VL Sitko, and S Kh Degtyarev.* [Real time Glal-PCR assay of regulation regions of human genes HDAC4, RARB and URB1](#)// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, vol 7(2), p.p. 667-676 (2016).
4. А.Г. Акишев, Д.А. Гончар, М.А. Абдурашитов, С.Х. Дегтярев. [Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BslI- и Glal ПЦР анализа.](#) // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова, Т. 7 , № 3 ,с. 5-16 (2011)
5. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. [BslI- и Glal- ПЦР анализ – новый метод исследования метилированных участков ДНК.](#) // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова, Т. 6 , № 1 ,с. 5-12 (2010)

## Информация для заказа

Описание продукта	Каталожн. №
Набор для Glal-ПЦР-анализа, 200 реакций	K011S
Набор для Glal-ПЦР-анализа, 1000 реакций	K011L

Отдельные фасовки	Каталожный №	Объем
Glal (20 е.а./мкл)	E493/ E494	100/500 е.а.
10X SE GLAD буфер	B013	1 мл
Смесь трифосфатов, 10 мМ каждый	N025	40 мкМ
SP Taq ДНК Полимераза (5 е.а./мкл)	E333/E334	200/1000 е.а.
Синтез флюоресцентного зонда	K011P	1 набор на 200 реакций
Синтез флюоресцентного зонда и праймеров	K011PP	1 набор на 200 реакций

## Услуги

Пожалуйста свяжитесь с нами ([info@sibenzyme.ru](mailto:info@sibenzyme.ru)) если вам нужна наша помощь с подбором структуры праймеров на интересующий вас RCGY сайт.

Набор праймеров и зондов может быть синтезирован заказчиком самостоятельно либо заказан отдельно.