

Encyclo Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу:
PK101 — на 200 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Область применения.....	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Основные характеристики	5
6. Протокол.....	5
7. Возможные проблемы и способы их решения	8

1. Назначение

Набор содержит все необходимые компоненты для постановки ПЦР: Encyclo полимеразу, три реакционных буфера, использование которых расширяет сферу применения фермента и облегчает работу по оптимизации условий реакции, dNTP и воду, свободную от нуклеаз.

Encyclo полимеразы — смесь термостабильных ДНК-полимераз с «горячим стартом» для эффективной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Область применения

- Амплификация фрагментов ДНК до 20 т.п.о.
- Амплификация сложных смесей ДНК, образцов тотальной кДНК.
- ПЦР с малых количеств ДНК.
- Амплификация низкокопийных последовательностей со сложных матриц (геномная ДНК, первая цепь кДНК и т.п.).

3. Состав

Компоненты набора	PK101 200 реакций по 25 мкл
50X Encyclo polymerase mix	100 мкл
10X Encyclo buffer	600 мкл
5X Encyclo Red buffer	1.2 мл
2X Encyclo GC buffer	3 мл (2 x 1.5 мл)
dNTP mix (10 mM each)	120 мкл
Deionized water, nuclease-free	4.5 мл (3 x 1.5 мл)

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Основные характеристики

- Высокая процессивность — до 20 т.п.о.
- 5' → 3' ДНК-полимеразная активность.
- Отсутствие 5' → 3' экзонуклеазной активности.
- Корректирующая 3' → 5' экзонуклеазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (95 °С, 5–10 с).
- Высокая специфичность амплификации.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в Т-вектора.

6. Протокол

► При постановке ПЦР соблюдайте зонирование помещений. Разделяйте зоны для приготовления реакционной смеси, внесения ДНК-матрицы, проведения ПЦР и анализа ПЦР-продукта.

1. Разморозьте при комнатной температуре все компоненты для ПЦР, кроме полимеразы. Перемешайте их содержимое на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

► При обнаружении осадка в 10X Encyclo buffer и 2X Encyclo GC, прогрейте буфер при +37 °С до полного растворения осадка.

2. Приготовьте реакционную смесь:

- рекомендуемый объем реакции — 25 мкл;
- для избежания погрешности дозаторов и дополнительных разведений компонентов реакции рекомендуется рассчитывать реакционную смесь минимум на 4 образца;
- используйте буфер в зависимости от задачи:
 - 10X Encyclo buffer подходит для большинства приложений, может быть использован для проведения ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I, Eva Green.
 - 5X Encyclo Red buffer удобно использовать для постановки реакций, продукты которых впоследствии анализируются с помощью гель-электрофореза. Буфер содержит красный и желтый красители, а также компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель. При использовании 5X Encyclo Red buffer рекомендуется увеличить количество циклов ПЦР на 1–2. В 1 % агарозном геле с 1X TAE буфером электрофоретическая подвижность красного красителя соответствует фрагменту ДНК размером 1000 п.о., желтый краситель мигрирует с фронтом на уровне фрагментов 20–30 п.о.
 - 2X Encyclo GC buffer рекомендуется для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (> 65 % GC).

Компонент*	Реакция с Encyclo буфером	Реакция с Encyclo Red буфером	Реакция с Encyclo GC буфером	Конечная концентрация компонента
Deionized water, nuclease-free	до 25 мкл	до 25 мкл	до 25 мкл	—
10X Encyclo buffer	2.5 мкл	—	—	1X
5X Encyclo Red buffer	—	5 мкл	—	1X
2X Encyclo GC buffer	—	—	12.5 мкл	1X
dNTP mix (10 mM each)	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	0.2 mM каждого
PCR-праймер 1	переменный	переменный	переменный	0.2–0.5 мкМ
PCR-праймер 2	переменный	переменный	переменный	0.2–0.5 мкМ
ДНК-матрица	переменный	переменный	переменный	1 пг – 200 нг на реакцию
50X Encyclo polymerase mix	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	1X

* Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

3. Аккуратно перемешайте реакционную смесь на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

4. Разнесите реакционную смесь в пробирки для ПЦР.

5. Внесите необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР. Оптимальная концентрация матрицы в реакции зависит от источника ДНК, степени ее очистки и длины ампликона. Для амплификации длинных фрагментов ДНК (более 3 т.п.о.) и высокотехнологичных приложений (RACE, genome walking и т.д.) необходимо использовать высокоочищенные ДНК-матрицы. Для амплификации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации.

6. При использовании амплификатора без нагревающейся крышки наложите поверх реакционной смеси минеральное масло.

7. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	92–95 °С	1–3 мин
Циклы ПЦР (до 50 циклов)	92–95 °С	5 с – 1 мин
	Tm* (55–68 °С)	5 с – 1 мин
	72 °С	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	72 °С	2–10 мин

* Tm – температура отжига праймера.

** Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК).

- Для работы с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC) рекомендуется:
 - увеличить продолжительность предварительной денатурации до 5 мин;
 - увеличить температуру денатурации до 98 °С;
 - увеличить количество циклов ПЦР на 2–7.
- Предварительная денатурация в течение 2–3 мин рекомендуется для геномной ДНК. В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0.5–1 мин.
- Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьируется от 55 до 68 °С. Для приблизительного расчета температуры отжига (Tm) можно воспользоваться формулой:

$$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов (Tm + 5 °С) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

При использовании 2X Encuslo GC буфера и ампликации сложных матриц температуру отжига праймеров может понадобиться снизить на 2–5 °С от расчетной.

- Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на 1–1.5 т.п.о.). Для увеличения выхода ПЦР-продукта используйте финальную достройку цепи на последнем цикле ПЦР в течение 2–3 мин.
- Рекомендуется по возможности минимизировать количество циклов ПЦР, так как избыточное их количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.

7. Возможные проблемы и способы

Приведенные ниже рекомендации могут быть использованы при решении проблем для большинства ПЦР приложений. Однако мы не можем гарантировать, что они применимы для всех приложений ПЦР, в которых может быть использован Encyclo Plus PCR kit.

7.1 Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции

Возможные проблемы	Причины и способы решения
1. Какой-либо компонент не был добавлен или испортился в процессе хранения.	Проверьте правильность приготовления реакционной смеси и повторите реакцию. Если вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: support@evrogen.ru.
2. Недостаточное число циклов ПЦР.	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3–5 циклов каждый раз.
3. Неправильно подобранная температура отжига праймеров или время отжига.	Поставьте несколько реакций с разной температурой отжига или используйте температурный градиент. Увеличьте время отжига на 3–4 с.
4. Слишком короткое время элонгации.	Постепенно увеличивайте время элонгации с шагом 30 с.
5. Неудачная структура праймера.	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
6. Фрагмент ДНК содержит высокий процент GC оснований.	Используйте 2X Encyclo GC buffer для амплификации фрагмента ДНК. При постановке реакции следуйте указаниям из п. 6.2 инструкции.
7. Слишком низкая или высокая концентрация ДНК-матрицы.	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
8. ДНК-матрица низкого качества.	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.
9. ДНК-матрица содержит ингибирующие ПЦР добавки.	Проведите очистку ДНК-матрицы.
10. Недостаточно полимеразы.	В редких случаях выход продукта ПЦР может быть увеличен путем увеличения концентрации полимеразы в реакционной смеси. Однако увеличение концентрации полимеразы более чем в два раза может привести к значительной фоновой амплификации.
11. Буфер, в котором растворена ДНК, имеет высокую концентрацию ЭДТА.	Если концентрация ЭДТА в образце ДНК-матрицы превышает 5 мМ, это может отрицательно сказаться на эффективности ПЦР, поскольку происходит связывание ионов Mg^{2+} в реакционном буфере.

7.2 Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле

Возможные проблемы	Причины и способы решения
1. Избыточное количество циклов ПЦР.	Повторите реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта на более ранних циклах.
2. Слишком низкая температура отжига.	Постепенно повышайте температуру отжига с шагом 2–3 °C или используйте температурный градиент.
3. Неудачная структура праймера.	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
4. Сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов.	Оптимизируйте условия реакции, используя 2X Encyclo GC buffer. При постановке реакции следуйте указаниям из п. 6.2 данной инструкции.
5. Контаминация посторонней ДНК-матрицей.	Контролируйте уровень контаминации компонентов ПЦР, автоматических пипеток и пробирок с помощью негативного контроля ДНКматрицы. В случае обнаружения контаминации замените загрязненный реактив и проведите очистку помещений и пипеток. При ПЦР с бактериальных колоний или фаговых бляшек невозможность изолировать отдельную колонию или бляшку может быть причиной множества полос.
6. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы.	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
7. Избыток полимеразы.	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию Encyclo полимеразы.

Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [Н](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [Н](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [Н](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [Н](#)▶▶▶ [С](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [Н](#)▶▶▶

Оценка ДНК [Н](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [Н](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [Н](#)▶▶▶

Генотипирование [Н](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [С](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [С](#)▶▶▶

Синтез генов [С](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [С](#)▶▶▶

[Н](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
НАБОРА

[С](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
СЕРВИСА

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru