



Encyclo Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу РК101

Инструкция по применению

Набор реактивов Encyclo Plus PCR kit предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Содержание

I.	Состав и условия хранения	1
II.	Описание продукта	1
II.1.	Encuslo полимераза	1
II.2.	Буферы	2
III.	Особенности использования Encuslo полимераза	3
III.1.	Автоматический "горячий старт"	3
III.2.	Протокол	3
IV.	Решение проблем	4
IV.1.	Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции .	4
IV.2.	Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле	6

I. Состав и условия хранения

Компонент	Количество
50X смесь полимераз Encyclo	100 мкл
10X Encyclo буфер	600 мкл
5X Encyclo Red буфер	1.2 мл
2X Encyclo GC буфер	2 x 1.5 мл
50X смесь dNTP (10 mM каждого)	120 мкл
Стерильная вода для ПЦР	3 x 1.5 мл

Хранение: хранить при -20°C.

При соблюдении условий хранения и транспортировки срок хранения 1 год.

II. Описание продукта

Набор реактивов "**Encyclo Plus PCR kit**" содержит все необходимые компоненты для постановки 200 стандартных ПЦР амплификаций объемом 25 мкл. В состав набора входят **три реакционных буфера**, использование которых расширяет сферу применения фермента и облегчает работу по оптимизации условий реакции.

II.1. Encyclo полимеразы

Encyclo полимеразы – специально разработанная смесь термо-стабильных ДНК полимераз с «горячим стартом» для эффективной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц. Encyclo-полимеразы обеспечивают высокую эффективность реакции и обладают повышенной точностью синтеза по сравнению с Taq-полимеразой. Свойства Encyclo полимеразы:

- Высокопроцессивная 5'>3' ДНК полимеразная активность
- Корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность
- Автоматический "горячий старт"
- Высокая специфичность
- Высокий выход продукта полимеразной реакции
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в T-вектора

II.2. Буферы

Концентрация магния в 1X реакционном буфере 3.5 мМ.

1. 10X Encyclo буфер подходит для большинства приложений, может быть использован для проведения ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I, Eva Green.

2. 5X Encyclo Red буфер содержит красный и желтый красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель. Буфер удобно использовать для постановки реакций, продукты которых впоследствии анализируются с помощью гель-электрофореза. Продукт ПЦР сразу наносится в гель без добавления буфера для нанесения проб. 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.

3. 2X Encyclo GC буфер рекомендуется для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC). При замораживании в 2X Encyclo GC буфере может образовываться осадок. В этом случае перед применением буфер следует прогреть на 50°C до полного растворения осадка и перемешать на вортексе.

При использовании Encyclo GC буфера следует внести следующие изменения в стандартную программу ПЦР:

- 1) увеличить продолжительность предварительной денатурации до 2 мин;
- 2) уменьшить температуру отжига праймера T_m на 2-5°C относительно расчетной величины;
- 3) увеличить количество циклов ПЦР на 2-7.

III. Особенности использования Encyclo полимеразы

III.1. Автоматический "горячий старт"

Encyclo полимеразы содержит антитела, блокирующие ее активность при комнатной температуре. Фермент активируется только после прогревания реакционной смеси.

III.2. Протокол

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Компонент*	Реакция с Encyclo буфером	Реакция с Encyclo Red буфером	Реакция с Encyclo GC буфером	Конечная концентр. компонента
Стерильная вода	до 25 мкл	до 25 мкл	до 25 мкл	–
10X Encyclo буфер	2.5 мкл	–	–	1X
5X Encyclo Red буфер	–	5 мкл	–	1X
2X Encyclo GC буфер**	–	–	12.5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	0.2 мМ 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 полимеразы	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	1X
Конечный объем	25 мкл	25 мкл	25 мкл	–

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

** Прогреть перед использованием до полного растворения осадка.

IV. Решение проблем

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".

IV.1. Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Какой-либо компонент не был добавлен или испортился в процессе хранения	Проверьте правильность приготовления реакционной смеси. Повторите реакцию, используя в качестве контроля праймеры и матрицу из набора PCR Control set (кат. # РК104). Если вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: customer-support@evrogen.ru
Недостаточное число циклов ПЦР	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3-5 циклов каждый раз.
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 сек.
Слишком короткое время элонгации	Постепенно увеличивайте время элонгации с шагом 30 сек.
Неудачная структура праймера	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
Фрагмент ДНК содержит высокий процент GC оснований	Используйте 2X Encyclo GC буфер для амплификации фрагмента ДНК. При постановке реакции следуйте указаниям из пп. II.2. данной инструкции.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Слишком низкая или высокая концентрация ДНК-матрицы	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
ДНК-матрица низкого качества	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.
ДНК-матрица содержит ингибирующие ПЦР добавки	Проведите очистку ДНК-матрицы.
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.
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.

IV.2. Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Избыточное количество циклов ПЦР	Повторите реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта на более ранних циклах.
Слишком низкая температура отжига	Постепенно повышайте температуру отжига с шагом 2-3°C или используйте температурный градиент.
Неудачная структура праймера	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
Сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов.	Оптимизируйте условия реакции, используя 2X Encyclo GC буфер. При постановке реакции следуйте указаниям из пп. II.2. данной инструкции.
Контаминация постоянной ДНК-матрицей	Контролируйте уровень контаминации компонентов ПЦР, автоматических пипеток и пробирок с помощью негативного контроля ДНК-матрицы. 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.
Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
Избыток полимеразы	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию Encyclo полимеразы.

Продукты и услуги компании Евроген

P – продукты

S – услуги

Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот, маркеры длин ДНК **P**

ПЦР, синтез кДНК и RACE **P S**

Клонирование ДНК **P S**

Нормализация кДНК **P S**

Учебные наборы **P**

Синтез олигонуклеотидов и секвенирование **S**

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**

Синтез генов и направленный мутагенез **S**

Приготовление библиотек кДНК **S**

Сложные сервисы **S**

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Клеточная биология

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция клеточных линий **S**

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Конструирование лентивирусных частиц **S**

Лентивирусные конструкции для РНК-интерференции **S**

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Молекулярная медицина

Наборы для детекции мутаций в протоонкогенах **P**

Услуги в области молекулярной онкологии **S**

Техническая поддержка: md-support@evrogen.ru

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

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус
70 (Технопарк ИБХ)
Тел.: +7 (495) 988-4083
Факс: +7 (495) 988-4085
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru