

Рекомендации по постановке ПЦР

К наборам реактивов

РК101, РК121.

К полимеразам

РК002S/L, РК013, РК014, РК015, РК016, РК022, РК123S/L.

К готовым смесям для ПЦР

РК041S/L, РК143S/L, РК145S/L, РК147S/L, РК149S/L, РК151S/L.

Содержание

I.	Важные рекомендации и замечания	1
I.1.	Снижение риска контаминации	1
I.2.	Положительный контроль	1
I.3.	Реакционная смесь для ПЦР	1
II.	Замечания о компонентах ПЦР	1
II.1.	Фермент	1
II.2.	Матрица	2
II.3.	Праймеры	3
III.	Условия ПЦР амплификации	4
III.1.	Денатурация	4
III.2.	Отжиг	5
III.3.	Элонгация	5
III.4.	Количество циклов ПЦР	5

I. Важные рекомендации и замечания

I.1. Снижение риска контаминации

Даже небольшие количества посторонней ДНК-матрицы могут привести к образованию неспецифического продукта в ходе ПЦР.

Для снижения риска кросс-контаминации мы рекомендуем:

- 1) смешивать реагенты для ПЦР в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и анализа продуктов ПЦР;
- 2) использовать наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром;
- 3) включать в эксперимент отрицательный контроль: использовать стерильную воду вместо ДНК-матрицы.

I.2. Положительный контроль

Положительный контроль необходим для проверки работы общих компонентов реакции. Для постановки контрольной реакции воспользуйтесь набором PCR Control set (кат. # РК104).

I.3. Реакционная смесь для ПЦР

При одновременной постановке нескольких ПЦР рекомендуется приготовление общей реакционной смеси, содержащей общие для всех реакций компоненты. Это позволяет уменьшить вариации количества различных компонентов от пробирки к пробирке.

II. Замечания о компонентах ПЦР

II.1. Фермент

Рекомендованная в наших инструкциях концентрация фермента является оптимальной для амплификации большинства ДНК-матриц. Увеличение количества полимеразы может привести к появлению неспецифических продуктов. При появлении фоновой амплификации, а также для амплификации фрагментов короче 500 п.о. (особенно при постановке ПЦР в реальном времени с красителем SybrGreen) мы рекомендуем снизить концентрацию полимеразы в реакционной смеси в 2 раза.

II.2. Матрица

Степень очистки ДНК-матрицы не существенна для многих простых приложений ПЦР. С помощью полимераз Евроген возможно проведение амплификации небольших фрагментов ДНК (до 1-2 т.п.о.) из клеточных лизатов, с бактериальных колоний, соскобов мягких тканей и пр. Однако для амплификации длинных фрагментов ДНК (более 3 т.п.о.) и для высокотехнологичных приложений (RACE, genome walking и т.д.) нужны высокоочищенные ДНК-матрицы.

Некоторые вещества (ионные детергенты, фенол, этанол, гемин, некоторые реагенты для ДНК-мечения), используемые в различных методиках для выделения ДНК, даже в небольших количествах могут ингибировать ПЦР.

Целостность ДНК матрицы важна при амплификации длинных фрагментов. Матрица, используемая для получения протяженных ампликонов (5 т.п.о и более), требует высокой степени очистки от ДНКаз. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца на +4°C без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежание её деградации. При очистке ДНК-матрицы из агарозного геля избегайте долгой УФ экспозиции, так как ультрафиолетовое облучение приводит к повреждению ДНК.

Для амплификации коротких участков геномной ДНК лучше использовать фрагментированную матрицу. Фрагменты длиной 200-1000 п.о. можно получить путем обработки ДНК ультразвуком или рестриктазами.

Оптимальная концентрация матрицы в реакции зависит от источника ДНК, степени ее очистки и длины ампликона. Для амплификации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации. Наши рекомендации по количеству ДНК-матрицы в реакционной смеси приведены в таблице 1.

Таблица 1. Оптимальное количество ДНК-матрицы на реакцию

Тип матрицы	Количество на реакцию (25-50 мкл)
Плазмидная и фаговая ДНК*	0.01-1 нг
Геномная ДНК бактерий*	0.1-10 нг
Геномная ДНК эукариот	10-500 нг
Индивидуальные фрагменты линейной ДНК	0.001-0.1 нг
кДНК	0.001-10 нг

* При амплификации геномной и плазмидной ДНК перед первым циклом ПЦР необходима предварительная денатурация матрицы при 92-95°C в течение 1-3 минут.

II.3. Праймеры

1. Концентрация. Оптимальные концентрации праймеров подбирается эмпирически. В однократной реакционной смеси концентрация обыкновенно варьируется в пределах 0.2-0.5 мкМ.

2. Структура. Средняя длина праймеров – 16-25 нуклеотидов. При дизайне праймеров следует учитывать их GC состав (40-60%) и температуру отжига (см. раздел III. Условия ПЦР амплификации.)

Использование праймеров с низкой температурой отжига может существенно увеличить количество неспецифических продуктов ПЦР. Разница в температуре отжига в паре праймеров не должна превышать 6 градусов.

При конструировании праймеров не используйте последовательности, которые могут формировать вторичные структуры в виде шпильки или дуплексов. Избегайте само- и взаимнокомплиментарности между 3'-концами (чтобы не образовывались праймер-димеры).

3. Очистка. Рекомендуется использовать праймеры с чистотой не менее 95%.

III. Условия ПЦР амплификации

Используйте параметры, указанные в Таблице 2, для создания программы ПЦР амплификации.

Оптимальные условия амплификации, такие, как температура, время инкубации и количество циклов ПЦР, могут варьировать в зависимости от множества факторов (характеристики амплификатора, объем пробы, свойства матрицы, структура праймеров). Окончательная оптимизация условий амплификации должна проводиться конечным пользователем индивидуально для каждого эксперимента.

Таблица 2. Условия ПЦР амплификации

Стадия	Количество циклов	Температура инкубации	Время
Предварительная денатурация	–	92-95°C	1-3 мин
Денатурация	10-38	92-95°C	5 сек - 1 мин
Отжиг		T _m	5 сек - 1 мин
Элонгация		72°C	1 мин/1-1.5 т.п.о.
Финальная элонгация*	–	T _m 72°C	5 сек - 1 мин 2-3 мин

* Финальная элонгация не является обязательной стадией. Она используется для увеличения выхода реакции (например, при препаративной наработке ДНК), для окончательной дупликации одноцепочечных фрагментов.

III.1. Денатурация

Предварительный прогрев в течение 2-3 мин рекомендуется для денатурации геномной или плазмидной ДНК. В остальных случаях рекомендуется использовать как можно более короткую стадию денатурации. Оптимальная продолжительность денатурации для фрагментов менее 3-5 т.п.о. – 15-20 сек., более 5 т.п.о. – до 1 мин.

III.2. Отжиг

Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и обычно варьирует от 55°C до 72°C.

Для приблизительного расчета температуры отжига праймера можно воспользоваться формулой:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{A}+\text{T}) + 4 \times (\text{G}+\text{C}).$$

Однако оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на 3-5 градусов позволяет повысить специфичность реакции. Легко подобрать оптимальную температуру отжига, используя градиентный термоамплификатор.

Для достижения высокой специфичности ПЦР рекомендуется использовать праймеры с высокой температурой отжига (например, 65-68°C).

Старайтесь использовать пары праймеров со сходной температурой отжига. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, для написания программы ПЦР выбирается наименьшая.

III.3. Элонгация

Элонгация в большинстве случаев происходит при температуре 72°C. Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на каждые 1-1.5 т.п.о.). Для увеличения выхода ПЦР-продукта используйте финальную элонгацию на последнем цикле ПЦР в течение 2-3 мин.

III.4. Количество циклов ПЦР

Мы рекомендуем по возможности минимизировать количество циклов ПЦР, так как избыточное их количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов, в том числе накоплению одноцепочечной ДНК.

III Условия ПЦР амплификации

Необходимое количество циклов ПЦР зависит от количества специфических молекул ДНК на старте амплификации. При идеальных условиях ПЦР эта зависимость отражается формулой:

$$N = 2^{(40-n)}$$

где "N" – количество молекул ДНК на старте амплификации, а "n" – количество циклов ПЦР, необходимых для получения продукта в концентрации 5-10 нг/мкл.

Например, необходимое количество циклов для амплификации ДНК-матрицы длиной 1 т.п.о. при оптимально подобранных условиях ПЦР можно определить по Таблице 3.

Таблица 3. Зависимость количества циклов ПЦР от количества ДНК-матрицы на старте ПЦР

Количество ДНК-матрицы на старте ПЦР (50 мкл реакции)	Количество циклов ПЦР для получения продукта в концентрации 5-10 нг/мкл
1 молекула	40 циклов
1000 молекул	30 циклов
10 ⁶ молекул (1 пг)	20 циклов
10 ⁹ молекул (1 нг)	10 циклов

При эффективном прохождении реакции на 40 цикле появляются продукты, полученные с единичной молекулы ДНК-матрицы, и зачастую такие продукты представляют собой результат контаминации. Это не относится к GC-богатым матрицам, эффективность амплификации которых сильно снижена даже при использовании специального GC буфера.

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**

Клеточная биология

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция и создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Конструирование лентивирусных частиц **S**

Лентивирусные конструкции для РНК-интерференции **S**

Молекулярная медицина

Наборы для детекции мутаций в протоонкогенах **P**

Услуги в области молекулярной онкологии **S**

Услуги в области молекулярной генетики наследственных заболеваний **S**

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

Техническая поддержка: customer-support@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