



# Encyclo Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу РК101

Инструкция по применению

## Содержание

1. Состав и условия хранения . . . . .	4
2. Описание продукта . . . . .	4
2.1. Encuslo полимераза . . . . .	4
2.2. Область применения . . . . .	5
2.3. Буферы . . . . .	5
2.4. Ограничение использования . . . . .	5
3. Руководство по постановке ПЦР . . . . .	6
3.1. Протокол . . . . .	6
3.2. ДНК-матрица . . . . .	7
3.3. Праймеры . . . . .	7
3.4. Параметры ПЦР . . . . .	8
3.5. Рекомендации по режиму амплификации . . . . .	8
4. Решение проблем . . . . .	9
4.1. Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции . . . . .	9
4.2. Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле . . . . .	11

## 1. Состав и условия хранения

Компонент	Количество
50X Encyclo polymerase Mix	100 µl
10X Encyclo buffer	600 µl
5X Encyclo Red buffer	1 200 µl
2X Encyclo GC buffer	2 x 1.5 ml
dNTP mix (10 mM each)	120 µl
Deionized water, nuclease-free	3 x 1.5 ml

**Хранение:** –20 °С.

При соблюдении условий хранения и транспортировки срок хранения – 1 год со дня поставки.

## 2. Описание продукта

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

### 2.1. Encyclo полимеразы

Encyclo полимеразы (50X Encyclo polymerase Mix) – специально разработанная смесь термостабильных ДНК-полимераз с «горячим стартом» для эффективной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц.

**Свойства Encyclo полимеразы:**

- «Горячий старт», обеспеченный антителами;
- 5' > 3' ДНК полимеразная активность с увеличенным выходом для длинных фрагментов;
- Корректирующая 3' > 5' экзонуклеазная активность;
- Высокая специфичность;
- Высокий выход продукта полимеразной реакции;
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в T-вектора.

## 2.2. 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.).

## 2.3. Буферы

**1. 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.

**2. 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.

**3. 2X Encyclo GC buffer** рекомендуется для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (> 65 % GC).

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 °С относительно расчетной величины;
- 3) Увеличить количество циклов ПЦР на 2–7.

При замораживании в 2X Encyclo GC буфере может образовываться осадок. В этом случае перед применением буфер следует прогреть при +50 °С до полного растворения осадка и перемешать на вортексе.

Концентрация магния в конечной реакции, при использовании любого из данных буферов – 3.5 мМ.

## 2.4. Ограничение использования

Только для научно-исследовательских целей.

## 3. Руководство по постановке ПЦР

### 3.1. Протокол

Конечные концентрации реагентов, предложенные в этом протоколе, оптимальны для амплификации ДНК-матриц длиной до 15 т.п.о. Увеличение количества полимеразы может привести к неспецифической амплификации. В ряде случаев при появлении фоновой амплификации мы рекомендуем снизить концентрацию Encyclo полимеразы в реакционной смеси в два раза.

В стерильной пробирке для ПЦР приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже. При отсутствии нагревающейся крышки в амплификаторе, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Компонент*	Реакция с Encyclo буфером	Реакция с Encyclo Red буфером	Реакция с Encyclo GC буфером	Конечная концентр. 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
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 (при +50 °C) до полного растворения осадка.

## 3.2. ДНК-матрица

**Степень очистки ДНК-матрицы** не существенна для многих простых приложений ПЦР. С помощью набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit» возможно проведение амплификации небольших фрагментов ДНК (до 1–2 т.п.о.) из клеточных лизатов, с бактериальных колоний, соскоба мягких тканей и пр. Однако для амплификации длинных фрагментов ДНК (более 3 т.п.о.) и 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, могут ингибировать ПЦР даже в небольших количествах.

При очистке ДНК-матрицы из агарозного геля избегайте долгой УФ-экспозиции, так как ультрафиолетовое облучение приводит к повреждению ДНК.

**Количество ДНК-матрицы**, необходимое для старта ПЦР, зависит от источника ДНК, степени ее очистки и длины амплифицируемого фрагмента. Для многих приложений оптимальное количество ДНК-матрицы, имеющей низкую сложность (например, плазмидная ДНК, ДНК фага  $\lambda$ ), составляет примерно 1 пг – 10 нг на 50 мкл реакции.

Рекомендуемое для старта ПЦР количество тотальной кДНК составляет примерно 20–50 нг на 50 мкл реакции, количество геномной ДНК высокой сложности (например, геномной ДНК человека) – 50–200 нг на 50 мкл реакции. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР или приводить к неспецифической амплификации.

## 3.3. Праймеры

Оптимальные концентрации праймеров в однократной реакционной смеси варьируют в пределах 0.2–0.5 мкМ.

Рекомендуется использовать пары праймеров с близкой температурой отжига.

Использование праймеров с низкой температурой отжига (ниже 50 °С) может существенно увеличить уровень неспецифических продуктов. Подробнее об определении оптимальной температуры отжига праймера написано в разделе 3.5. Рекомендации по режиму амплификации.

При конструировании праймеров не используйте последовательности, которые могут формировать вторичные структуры в виде шпилек или дуплексов.

Для более эффективного клонирования продукта амплификации в ТА-вектора на 5'-конце рекомендуется добавлять нуклеотидный остаток G.

### 3.4. Параметры ПЦР

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

Для амплификации большинства матриц размером от 50 п.о. до 7 т.п.о. воспользуйтесь предложенными ниже параметрами и рекомендациями по режиму амплификации. Окончательная оптимизация условий амплификации должна проводиться пользователем индивидуально для каждого эксперимента.

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	92–95 °C	1–3 мин
Денатурация		92–95 °C	5 с – 1 мин
Отжиг	10–35	T <sub>m</sub> * (55–68 °C)	5 с – 1 мин
Элонгация		72 °C	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	1	72 °C	2–10 мин

\* T<sub>m</sub> – температура отжига праймера.

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

### 3.5. Рекомендации по режиму амплификации

- 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 °C. Для приблизительного расчета температуры отжига (T<sub>m</sub>) 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 (T<sub>m</sub> + 5 °C) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

При использовании 2X Encyclo-GC буфера и амплификации 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.

## 4. 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".

### 4.1. Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Недостаточное число циклов ПЦР	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3–5 циклов каждый раз.
Слишком низкая или высокая концентрация ДНК-матрицы	Поставьте несколько реакций с серией 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.
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.

продолжение на следующей странице




Возможная причина проблемы	Варианты решения
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: <a href="mailto:support@evrogen.ru">support@evrogen.ru</a>
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.
Слишком короткое время элонгации	Постепенно увеличивайте время элонгации с шагом 30 с.
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 buffer для амплификации фрагмента ДНК. При постановке реакции следуйте указаниям из п. 2.3 данной инструкции.
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.


## 4.2. 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 высокая концентрация ДНК-матрицы	Поставьте несколько реакций с серией последовательных разведений матрицы.
Контаминация посторонней ДНК-матрицей	Контролируйте уровень контаминации компонентов ПЦР, автоматических пипеток и пробирок с помощью NTC (контроля без 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 низкая температура отжига	Постепенно повышайте температуру отжига с шагом 2–3 °С или используйте температурный градиент.
Неудачная структура праймера	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно 3'-концевых областях.
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. 2.3. данной инструкции.
Избыток полимеразы	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию Encyclo полимеразы.



## Наборы и сервисы Евроген



 – ссылка на страницу НАБОРА


Выделение и очистка нуклеиновых кислот 


 – ссылка на страницу СЕРВИСА



Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ 

Синтез и амплификация кДНК  

Клонирование ДНК  

Выявление контаминации микоплазмой 


Оценка ДНК 

Нормализация кДНК  

Практикум по геной инженерии 

Генотипирование 

Синтез олигонуклеотидов и зондов 

Секвенирование по Сэнгеру 

Синтез генов 

Сайт-направленный мутагенез 

**Консультация по продуктам:** [support@evrogen.ru](mailto:support@evrogen.ru)

**Подробную информацию о наших наборах и сервисах  
можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)**

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