

Рекомендации по постановке ПЦР

Содержание

I.	Компоненты ПЦР	3
I.1.	Фермент	3
I.2.	Матрица	3
I.3.	Праймеры	4
II.	Рекомендации для снижения вероятности ошибок при постановке ПЦР	5
II.1.	Снижение риска контаминации	5
II.2.	Положительный контроль	5
II.3.	Реакционная смесь для ПЦР	5
III.	Условия ПЦР	6
III.1.	Денатурация	6
III.2.	Отжиг	7
III.3.	Элонгация	7
III.4.	Количество циклов ПЦР	7

I. Компоненты ПЦР

I.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.

I.2. Матрица

1. Чистота. Степень очистки ДНК-матрицы незначительна для многих простых приложений ПЦР. С помощью полимераз производства компании Евроген возможно проведение амплификации небольших фрагментов ДНК (до 1-2 т.п.о.) из клеточных лизатов, 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.

Матрица, используемая для получения протяженных ампликонов (5 т.п.о. и более), требует высокой степени очистки от ДНКаз.

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.

2. Степень фрагментации. Целостность ДНК матрицы важна при амплификации длинных фрагментов. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца при +4 °С без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежание ее 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.

3. Концентрация. 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 денатурации матрицы при 92-95 °С в течение 1-3 минут.

I.3. Праймеры

1. Концентрация. Оптимальные концентрации праймеров подбираются эмпирически. В конечной реакционной смеси концентрация обычно варьируется в пределах 0.2-0.5 мкМ.

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

Использование праймеров с низкой температурой отжига может существенно увеличить количество неспецифических продук-

II Рекомендации для снижения вероятности ошибок при постановке ПЦР

тов ПЦР. Разница в температуре отжига в паре праймеров не должна превышать 6 °С.

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

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

II. Рекомендации для снижения вероятности ошибок при постановке ПЦР

II.1. Снижение риска контаминации

Даже небольшое количество посторонней ДНК-матрицы может быть амплифицировано 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.

II.2. Положительный контроль

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

II.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 компонентов от пробирки к пробирке.

III. Условия ПЦР

Для создания программы ПЦР используйте параметры, указанные в таблице 2.

Оптимальные условия амплификации, такие как температура, время инкубации и количество циклов ПЦР, зависят 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	1	92-95 °С	1-3 мин
Денатурация	10-38	92-95 °С	5 сек – 1 мин
Отжиг		T _m	5 сек – 1 мин
Элонгация		72 °С	1 мин / 1-1.5 т. п. о.
Финальная элонгация*	1	72 °С	2-3 мин

* Финальная элонгация не является обязательной стадией. Она используется для увеличения выхода реакции (например, при препаративной наработке ДНК), для окончательной дубликации 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 варьируется от 55 °С до 72 °С.

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

Для приблизительного расчета температуры отжига праймера можно воспользоваться формулой:

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

Однако оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев ее повышение на 3-5 градусов позволяет повысить специфичность реакции. Подобрать оптимальную температуру отжига можно с помощью градиентного термоамплификатора.

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

III.3. Элонгация

Элонгация в большинстве случаев происходит при температуре 72 °С. 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 к накоплению одноцепочечной ДНК.

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>>> – ссылка на страницу
ПРОДУКТА

Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки
нуклеиновых кислот **P**>>>

Маркеры длин ДНК **P**>>>

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**>>>

Приготовление библиотек кДНК **P**>>> **S**>>>

Синтез кДНК и RACE **P**>>> **S**>>>

Клонирование ДНК **P**>>> **S**>>>

Нормализация кДНК **P**>>> **S**>>>

Практикум по генной инженерии **P**>>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**>>>

Секвенирование по Сэнгеру **S**>>>

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**>>>

Синтез генов **S**>>>

Сайт-направленный мутагенез **S**>>>

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**>>>

Флуоресцентные белки **P**>>>

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**>>>

Антитела против флуоресцентных белков **P**>>>

Временная трансфекция клеточных линий **S**>>>

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**>>>

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**>>>

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии
и генетики наследственных заболеваний **S**>>>

Техническая поддержка: oncology@evrogen.ru

Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

корпус 15

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru