

# Рекомендации по постановке ПЦР

## Содержание

1. Компоненты ПЦР . . . . .	3
1.1. Фермент . . . . .	3
1.2. Матрица . . . . .	3
1.3. Праймеры . . . . .	4
2. Рекомендации для снижения вероятности ошибок при постановке ПЦР . . . . .	5
2.1. Снижение риска контаминации . . . . .	5
2.2. Реакционная смесь для ПЦР . . . . .	5
3. Условия ПЦР . . . . .	6
3.1. Денатурация . . . . .	6
3.2. Отжиг . . . . .	7
3.3. Элонгация . . . . .	7
3.4. Количество циклов ПЦР . . . . .	7

## 1. Компоненты ПЦР

### 1.1. 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.

### 1.2. 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.

## 1 Компоненты ПЦР

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

### 1.3. 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-

## 2 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 взаимодоплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывались праймер-димеры).

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

## 2. Рекомендации для снижения вероятности ошибок при постановке ПЦР

### 2.1. 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.

### 2.2. 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.

### 3. 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 <sub>m</sub>	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 дупликации одноцепочечных фрагментов.

#### 3.1. 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.

### 3.2. 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:

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

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.

### 3.3. 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.

### 3.4. 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.

### 3 Условия ПЦР

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 <sup>6</sup> молекул (1 пг)	20 циклов
10 <sup>9</sup> 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.





## 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 генной 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)