

Mint kit-2

Набор реактивов для синтеза двухцепочечной кДНК

Номер по каталогу: SK005 — на 20 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Область применения	4
3. Состав	6
4. Условия хранения и транспортировки	6
5. Количество реакций	6
6. Метод	7
7. Основные характеристики	9
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы	10
9. Биологический материал	10
10. Протокол	11
11. Возможные проблемы и способы их решения	16
12. Приложение А. Рекомендации к дальнейшей работе с полученной дц-кДНК	19
13. Приложение Б. Подготовка дц-ДНК, фланкированной адаптерам PlugOLigo-3M и CDS-4M, к направленному клонированию	20
14. Приложение В. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами PlugOligo-3M и CDS-4M, к секвенированию на платформах SOLiD или Illumina	21
15. Приложение Г. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами PlugOligo-3M и CDS-4M, к секвенированию на платформе Roche 454	23
16. Приложение Д. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами	25

1. Назначение

Набор реактивов Mint kit-2 предназначен для синтеза обогащенной полноразмерными последовательностями двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) на матрице поли(A) или тотальной РНК.

Полученная дц-кДНК может быть использована для получения кДНК библиотек для направленного и ненаправленного клонирования, нормализации кДНК с помощью набора реактивов Trimmer-2 (кат. # NK003, Евроген), NGS на платформах Roche/454, ABI/SOLiD или Illumina/Solexa и других приложений.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Область применения

В состав набора Mint kit-2 входят несколько вариантов адаптеров PlugOligo и CDS, что позволяет осуществлять синтез дц-кДНК с различными фланкирующими последовательностями. Выбор пары адаптеров для синтеза кДНК зависит от дальнейшего применения.

Применение	5′-адаптер / З′-адаптер
Получение кДНК библиотек для ненаправленного клонирования	
Секвенирование по Сэнгеру	
Выделение полноразмерной кДНК, RACE	PlugOligo-1 / CDS-1
Нормализация кДНК с последующим ненаправленным клонированием нормализованной кДНК библиотеки и/или секвенирование по Сэнгеру	

Адаптеры содержат протяженные общие последовательности и сайты рестрикции Rsal. Данные участки позволяют проводить синтез кДНК, фланкированной идентичными последовательностями на 3'- и 5'-концах. Длина адаптеров сведена к минимуму, что повышает качество получаемой кДНК.

Применение	5´-адаптер / З´-адаптер
Получение кДНК библиотек для направленного клонирования	
Секвенирование на платформах SOLiD или Illumina	PlugOligo-3M / CDS-4M
Нормализация кДНК с последующим направленным клонированием нормализованной библиотеки кДНК для скрининга на платформах SOLiD или Illumina	ge.nge e / e.z.e

Адаптеры содержат асимметричные сайты рестрикции Sfil (SfiA и SfiB, Рисунок 1). Данные сайты, включенные в последовательность 5′- и 3′-концов кДНК, позволяют проводить направленное клонирование библиотеки кДНК. После обработки эндонуклеазой Sfil и фракционирования по размеру, кДНК может быть лигирована в подходящий вектор, также обработанный Sfil. В связи с тем, что Sfil отщепляет излишние части фланкирующих адаптеров, полученная кДНК идеально подходит для секвенирования на платформах SOLiD или Illumina.

Применение	5´-адаптер / З´-адаптер
Секвенирование на платформе Roche/454	PlugOligo-3M / CDS-4M
Нормализация кДНК с последующим секвенированием на платформе Roche/454	или PlugOligo-1 / CDS-Gsu

Наличие протяженных поли(A:T)-хвостов в кДНК может приводить к получению прочтений низкого качества на платформе Roche/454. В состав набора Mint kit-2 входят два альтернативных З´-концевых адаптера, предназначенных для получения прочтений более высокого качества:

- адаптер CDS-4M содержит поли(Т)-часть, состоящую из тимидинов, чередующихся с другими нуклеотидами. Данный адаптер позволяет осуществлять 454-секвенирование через модифицированные поли(А:Т)-хвосты полученной кДНК;
- адаптер CDS-Gsu содержит сайт рестркиции Gsul (Рисунок 1), расположенный перед поли(Т)-последовательностью. Gsul расщепляет кДНК внутри поли(А)-хвоста и уменьшает длину. Последующие прочтения начинаются с более короткой тимидиновой последовательности.

Оба адаптера позволяют проводить синтез кДНК, подходящей для секвенирования на платформе Roche/454. Применение адаптера CDS-4M не требует обработки кДНК рестриктазами перед секвенированием. Однако даже модифицированные поли(A:T)-хвосты могут приводить к получению прочтений низкого качества на некоторых платформах Roche/454. кДНК, полученная с помощью адаптера CDS-Gsu с последующей обработкой рестриктазой Gsul, содержит более короткие поли(A:T)-хвосты, не оказывающие негативного влияния на качество прочтений. При этом кДНК, содержащая внутренние сайты Gsul, также будет расщеплена, что в результате может привести к сложностям при сборке контигов.

SfilA site	SfilB site	Gsul site
5' - GGCCATTACGGCC - 3'	5' – GGCC GCCT CGGCC – 3'	5' - CTGGAG(N) ₁₆ - 3'
3' - CCGGTAATGCCGG - 5'	3' – CCGG CGGAG CCGG – 5'	3' − GACCTC(N) ₁₄ − 5'

Рисунок 1 — сайты распознавания Sfil and Gsul.

3. Состав

Компонент	Количество
Mint reverse transcriptase	20 μΙ
5X First strand buffer	80 μΙ
DTT (20 mM)	30 μΙ
dNTP mix (10 mM each)	120 μΙ
IP-solution	130 μΙ
PCR M1 primer (10 µM)	150 µl
454 PCR primer mix (10 μM each)	100 μΙ
50X Encyclo polymerase mix	100 μΙ
10X Encyclo buffer	600 μΙ
Deionized water, nuclease-free	3 ml (2 x 1.5 ml)
Control total RNA (0.5 µg/µl)	15 µl
5'-end PlugOligo adapters	
PlugOligo-1 adapter (15 μM)	25 μΙ
PlugOligo-3M adapter (15 μM)	25 μΙ
3'-end PlugOligo adapters	
CDS-1 adapter (10 µM)	25 μΙ
CDS-Gsu adapter (10 µM)	25 μΙ
CDS-4M adapter (10 µM)	25 μΙ

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: -20 °C.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 20 реакций.

6. Метод

В основе метода синтеза дц-кДНК лежит свойство Mint ревертазы добавлять нематрично на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков (преимущественно dC). Схема метода приведена на Рисунке 2.

Первую цепь кДНК синтезируют на РНК матрице с использованием З´-концевого адаптера CDS, содержащего олиго(dT) последовательность. Образующаяся первая цепь содержит последовательность З´-праймера на 5´-конце и олиго(dC) последовательность на З´-конце.

Эта олиго(dC) последовательность служит местом отжига 30-мерного олигонуклеотидного адаптера (PlugOligo), имеющего комплементарную олиго(dG) последовательность на 3´-конце.

Ревертаза воспринимает PlugOligo как продолжение PHK матрицы и продолжает синтез первой цепи. Таким образом, первая цепь кДНК оказывается фланкирована с одной стороны последовательностью З'-праймера, а с другой — последовательностью, комплементарной PlugOligo.

Первую цепь кДНК амплифицируют в ПЦР с праймером М1, соответствующим внешней части PlugOligo и З'-праймера. Использование Encyclo полимеразы позволяет получать дц-кДНК, обогащенную полноразмерными последовательностями. За счет использования PlugOligo с заблокированным З'-концом достигается существенное снижение (по сравнению с аналогами) нежелательной фоновой амплификации.

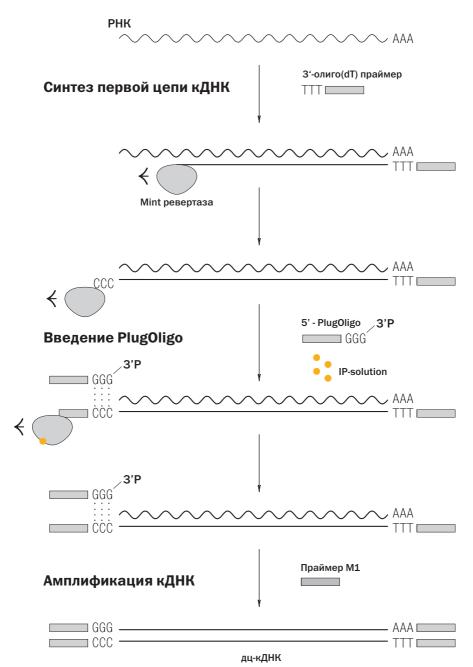


Рисунок 2 — схема синтеза дц-кДНК с использованием набора реактивов Mint kit-2.

При использовании РНК низкого качества в реакцию необходимо добавить IP-solution.

7. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Оптимальная температура работы	42 °C
Максимальная длина синтезируемой дц-кДНК	До 5 т.п.о.*
Количество биоматериала	250 нг – 2 мкг тотальной РНК 100 нг – 1 мкг поли(A) РНК
Активность РНКазы Н	Отсутствует

^{*} При условии использования РНК высокого качества (параметры качественной РНК см. в п.9).

Название	Последовательность
PCR M1 primer (10 µM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
454 PCR primer mix (10 μM each)	5'-CAACGCAGAGTGGCCATTAC-3' 5'-ACGCAGAGTGGCCGAGGCGGCCTTTTGTCTTTCTTCTGTTTCTTTT-3'
PlugOligo-1 adapter (15 μM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
PlugOligo-3M adapter (15 μM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGCGGG-3'
CDS-1 adapter (10 µM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN-3'
CDS-Gsu adapter (10 µM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTGGAG(T) ₂₀ VN-3'
CDS-4M adapter (10 µM)	$5'\text{-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT}\underline{\text{GGCCGAGGCGGCC}}(\text{T})_4\text{G}(\text{T})_{13}\text{VN-3}'$

Сайты эндонуклеаз подчеркнуты: Rsal, Sfil and Gsul; N = A, C, G or T; V = A, G or C.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат.
- Амплификатор.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 2, 10, 20 и 200 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 или 2 мл.
- Пробирки для ПЦР, совместимые с амплификатором.

9. Биологический материал

щью гель-электрофореза в агарозном геле.

Минимальное стартовое количество РНК для синтеза первой цепи кДНК составляет 250 нг тотальной или 100 нг поли(A) РНК. Для достижения наилучшего результата рекомендуется использовать 1-2 мкг тотальной РНК или 0.5-1 мкг поли(A) РНК.

▶ Эффективность синтеза кДНК с помощью набора реактивов Mint kit-2 определяется качеством РНК.

Для выделения РНК рекомендуется использовать реагент ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген) или набор RNASolo (кат. ## BC034T/S, Евроген). После выделения РНК рекомендуется провести оценку ее качества с помо-

РНК, пригодная для синтеза кДНК, имеет следующие характеристики:

- Тотальная РНК из тканей млекопитающих на агарозном геле выглядит как 2–3 четкие полосы. В зависимости от метода выделения короткоцепочечные формы РНК (5S, 5.8S, тРНК) могут отсутствовать. Верхние полосы 28S и 18S рибосомальной РНК имеют подвижность приблизительно соответствующую подвижности фрагментов ДНК длиной 4.5 и 1.9 т.п.о. Соотношение интенсивности полос 28S к 18S рРНК должно быть в интервале 1.5–2.5 к 1. Изменение соотношения в пользу 18S рРНК свидетельствует о частичной деградации выделенной РНК.
- Поли(A) РНК млекопитающих выглядит как шмер от 0.1 до 4-7 т.п.о., содержащий слабовыраженные 28S и 18S полосы.
- РНК из других организмов может иметь иные характеристики: количество полос и их подвижность могут отличаться.

Наличие геномной ДНК в образцах РНК, как правило, не оказывает заметного влияния на качество синтезируемой кДНК. Использование ДНКаз для удаления геномной ДНК не рекомендуется. В случае необходимости, избыток геномной ДНК может быть удален переосаждением образцов РНК в 12М LiCl или фенол-хлороформной экстракцией.

10. Протокол

Общее время работы: 1.5 часа.

Внимание! Все манипуляции с РНК проводить в зоне, свободной от РНКаз. Во время работы использовать перчатки, наконечники с фильтром и другой лабораторный пластик, свободный от РНКаз.

В процессе работы РНК и компоненты набора держать на льду.

Рекомендации по проведению синтеза кДНК: при подборе и оптимизации условий синтеза кДНК используйте образец ПКО, входящий в состав набора (Control total RNA), в количестве 1 мкл в реакцию.

10.1. Синтез первой цепи кДНК и введение PlugOligo

1. Для каждого образца РНК смешайте в пробирке следующие компоненты:

РНК: 250 нг – 2 мкг тотальной РНК

или **100** нг – **1** мкг поли(A) РНК;

Праймеры: 1 мкл CDS-1 adapter (10 µM)*;

1 мкл PlugOligo adapter (15 µМ)*;

Вода: Доведите объем до 5 мкл водой

(Deionized water, nuclease-free).

- ▶ Для предотвращения агрегации РНК, перед взятием аликвот прогрейте образцы РНК при 65°С в течение 1–2 минут, перемешайте содержимое и сбросьте капли со стенок пробирки на мини-центрифуге.
- 2. Прогрейте смесь 2 минуты при 70 °C, перенесите образцы в лед.
- 3. Добавьте 5 мкл предварительно подготовленной смеси:

```
2 мкл 5X First strand buffer;
```

1 мкл dNTP mix (10 mM each);

1 мкл DTT (20 mM);

1 мкл Mint reverse transcriptase (добавить в последнюю очередь!).

- ▶ Рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген).
- 4. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- 5. Проведите инкубацию:

```
42°C — от 50 минут до 2 часов;
```

 $70\,^{\circ}\text{C}$ — 10 минут, после чего охладить во льду.

^{*} Для выбора подходящих адпатеров см. п. 2 «Область применения».

ВНИМАНИЕ! Если РНК низкого качества (признаки деградации, присутствуют ингибиторы), то проведите инкубацию по протоколу:

42°C — 20 минут;

добавьте в каждую пробирку по 5 мкл IP-solution;

42°С — от 30 минут до 1.5 часов;

 $70\,^{\circ}\text{C}$ — 10 минут, после чего охладить во льду.

- Для сохранения объема реакции рекомендуется добавлять минеральное масло для ПЦР (15–20 мкл) и/или использовать амплификатор с нагревающейся крышкой.
- ▶ В ходе реакции на дне пробирок может сформироваться бурый осадок. Он не мешает синтезу и хранению кДНК.

Полученная первая цепь кДНК может быть использована немедленно для приготовления дц-кДНК или храниться при $-20\,^{\circ}$ С в течение 1 месяца. После размораживания кДНК перед использованием прогрейте образец при 65 °С в течение 1 минуты, перемешайте содержимое пробирки.

10.2. Амплификация кДНК

Рекомендации по проведению амплификации кДНК (синтез дц-кДНК):

- определите оптимальное количество циклов ПЦР для амплификации кДНК. Избыточное количество циклов приводит к накоплению неспецифического продукта и может существенно искажать результаты эксперимента. Недостаточное количество циклов приводит к небольшому количеству продуктов амплификации дц-кДНК;
- для контроля прохождения реакции используйте кДНК, полученную с образца ПКО (Control total RNA) на первом этапе.

10.2.1. Предварительная аналитическая амплификация

- Предварительная аналитическая амплификация необходима для подбора оптимального количества кДНК в реакции и количества циклов ПЦР.
- 1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь:

40 мкл Deionized water, nuclease-free;

5 мкл 10X Encyclo buffer;

1 мкл dNTP mix (10 mM each);

2 мкл PCR M1 primer (10 μ M);

1 мкл 50X Encyclo polymerase mix;

1 мкл Первая цепь кДНК.

- 2. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на миницентрифуге.
- 3. Разделите реакционную смесь на 3 аликвоты по 16 мкл (S1–S3) в пробирки для ПЦР.

4. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °C	1 мин
Денатурация		95 °C	15 c
Отжиг	N циклов*	66 °C	20 c
Элонгация		72 °C	3 мин

^{*} Каждая аликвота (S1-S3) должна быть амплифицирована на разных циклах. Количество циклов определяется исходя из типа исходной РНК и ее количества в реакции синтеза кДНК (см. Таблицу 1).

Таблица 1 — количество циклов ПЦР для предварительной амплификации.

Количество		Количество циклов ПЦР для образца		
тотальной РНК*		S1	S2	S3
2.0 мкг	0.5-1.0 мкг	13-14	16-17	19-20
1.0-2.0 мкг	0.25-0.5 мкг	14-15	17-18	20-21
0.5-1.0 мкг	0.1-0.25 мкг	15-16	18-19	21-22
0.25-0.5 мкг	0.1 мкг	17-18	20-21	23-24

^{*} Указано количество РНК, которое использовалось для синтеза первой цепи кДНК.

- 5. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, ТАЕ буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку, в качестве маркера длин используйте 100 нг DNA ladder 1kb (кат. # NL001, Евроген)).
- 6. Сравните результат гель-электрофореза с приведенным на Рисунке 3. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца исходя из следующих рекомендаций:
- При оптимальном количестве циклов ПЦР продукт реакции при анализе на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики:

(а) шмер умеренной интенсивности ожидаемой длины

Для дц-кДНК млекопитающих общая интенсивность шмера должна примерно соответствовать той, которую имеют образцы дц-кДНК, показанные на дорожках 2–3, Рисунок 3 (сравнение относительно интенсивности маркера).

Если интенсивность шмера не нарастает с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4, Рисунок 3), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации.

Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1, Рисунок 3), значит, количество циклов ПЦР было недостаточно для амплификации этого образца.

Как правило, распределение длин молекул в образце дц-кДНК примерно соответствует распределению длин в образце исходной РНК. Для большинства образцов из тканей млекопитающих дц-кДНК, обогащенная полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0.5 до 6 т.п.о. При этом дц-кДНК из других организмов может иметь меньший размер, например, до 3 т.п.о. (Рисунок 4).

(б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

При подозрении, что все образцы были подвергнуты недостаточному количеству циклов ПЦР, добавьте 2–3 дополнительных цикла и повторите анализ на гель-электрофорезе.

Шмер, частично смещенный к лунке, с размытыми или отсутствующими характеристическими полосами, свидетельствует об избыточной амплификации образца кДНК.

• Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция вышла на плато. Оптимальное для амплификации образца количество циклов должно быть на 1–2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато.

Слабовыраженные полосы на фоне малоинтенсивного шмера свидетельствуют о недостаточном количестве циклов ПЦР.

Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов. На Рисунке 3 приведен результат амплификации кДНК из мозга мыши.

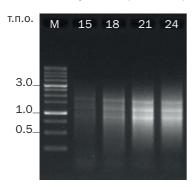


Рисунок 3 — результат гель-электрофореза (1.2% агароза) амплифицированной дц-кДНК с РНК из мозга мыши.

Количество циклов ПЦР указано над дорожками.

М — маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген). После 21 цикла в продукте ПЦР наблюдается появление высокомолекулярной фракции, что свидетельствует об избыточной амплификации. Так как реакция выходит на плато после 20 циклов ПЦР, оптимальным для амплификации данного образца является использование 18–19 циклов ПЦР.

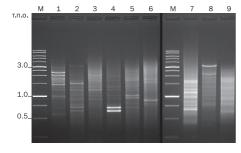


Рисунок 4 — результат гель-электрофореза (1.2 % агароза) образцов дц-кДНК из различных источников, приготовленных с помощью набора Mint kit-2:

- (1) печень мыши;
- (2) скелетная мышца мыши;
- (3) мозг мыши:
- (4) лейкоциты человека;
- (5) легкое человека;
- (6) скелетная мышца человека;
- (7) личинка комара;
- (8) копепода Pontella sp.;
- (9) лист томата Lycopersicon esculentum.
- M маркер длин ДНК DNA ladder 1 kb (кат. # NLOO1. Евроген).

10.2.2. Препаративная наработка дц-кДНК

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь:

40 мкл Deionized water, nuclease-free:

5 мкл 10X Encyclo buffer;

1 мкл dNTP mix (10 mM each); 2 мкл PCR M1 primer (10 μ M);

1 мкл 50X Encyclo polymerase mix.

- 2. Аккуратно перемешайте реакционную смесь на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.
- 3. Разнесите по 49 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.
- 4. Внесите по 1 мкл первой цепи кДНК к каждой реакционной смеси. Перемешайте содержимое пробирок пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- 5. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
Денатурация		95 °C	15 c
Отжиг	N циклов*	66 °C	20 c
Элонгация		72 °C	3 мин
	4	66 °C	20 c
Финальная элонгация	1 цикл	72 °C	3 мин

^{*} Количество циклов определяется исходя из типа исходной РНК и ее количества в реакции синтеза кДНК. Используйте данные, полученные в п. 10.2.1 «Предварительная аналитическая амплификация».

6. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР (дц-кДНК) с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, ТАЕ буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку). Используйте 100 нг DNA ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген).

дц-кДНК можно хранить при -20 °C в течение 6 месяцев.

11. Возможные проблемы и способы их решения

	_	_
Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой или продукт ПЦР отсутствует в положительном контроле.	1. РНК могла деградировать во время хранения или реакции синтеза первой цепи.	1. Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Убедитесь, что ваши реагенты, рабочая зона и инструментарий не загрязнены нуклеазами. Проверьте качество РНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Если Вы подозреваете, что проблема — деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген) как указано в разделе: "Предварительная аналитическая амплификация".
	2. Ошибка в процессе работы.	2. Проверьте не была ли допущена ошибка в процессе работы. Повторите синтез кДНК, используя новую порцию контрольной РНК. Убедитесь, что РНК была прогрета и перемешена перед взятием аликвоты.
	3. Использованы неоптимальные параметры ПЦР.	3. Оптимальные параметры ПЦР зависят от амплификатора, времени хранения ферментов, природы РНК. Если ПЦР выходит на плато через 25 циклов и более, возможно, были использованы неоптимальные параметры ПЦР. Осуществите оптимизацию параметров ПЦР (Раздел "Возможные трудности и их решение: Оптимизация параметров ПЦР") и повторите амплификацию, используя новую порцию первой цепи кДНК. Если не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: support@evrogen.ru.
	4. Образцы оц-кДНК были не полностью разморожены.	4. Если оц-кДНК была заморожена перед нанесением на агарозный гель, аликвоту необходимо прогреть при 72°С в течение 2 минут и тщательно перемешать.
2. Оптимизация параметров ПЦР.	1. Слишком высокая температура отжига. 2. Слишком высокая или низкая температура денатурации.	1. Постепенно снижайте температуру отжига с шагом 2–4°С. 2. Постепенно снижайте/увеличивайте температуру денатурации с шагом 1°С.

Возможные	проблемы

3. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой или продукт ПЦР отсутствует в экспериментальных образцах. В то же время в контро-

ле — хорошее качество

ПЦР.

Возможная причина

1. Экспериментальная РНК деградирована или имеет низкую концентрацию.

Варианты решения

1. Проверьте качество и концентрацию РНК с помощью электрофореза в агарозном геле.

Проверьте стабильность РНК, инкубируя аликвоту РНК при 42°С в течение 1 ч. после чего проверьте ее качество гель-электрофорезе, сравнив с неинкубированной РНК.

Если РНК деградировала во время инкубации, повторите выделение РНК другим методом или проведите дополнительную очистку РНК с помощью нескольких последовательных экстракций фенолом-хлороформом. Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК.

Если Вы подозреваете, что проблема деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген) как указано в разделе: "Предварительная аналитическая амплификация".

2. В ряде случаев переосаждение РНК этанолом или LiCl позволяет избавиться нежелательных примесей. Если переосаждение не помогает, используйте иной метод выделения РНК.

2. Образцы РНК могут содержать нежелательные добавки, ингибирующие синтез кДНК.

Недостаточное число

4. Продукт ПЦР хорошего качества. циклов ПЦР. но низкой концентрации.

Увеличьте число циклов ПЦР, добавив 2-3 дополнительных цикла (плюс финальная элонгация). Если увеличение количества циклов не приводит к увеличению выхода ПЦР, повторите амплификацию, изменив количество первой цепи (уменьшить или увеличить в 2 раза).

Если концентрация продукта ПЦР остается недостаточной, повторите синтез первой цепи, использовав большее количество РНК на старте.

Если амплификация образца кДНК требует более 25 циклов, такой образец может не содержать редких транскриптов.

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
5. При анализе на гель- электрофорезе отсут- ствуют яркие полосы, соответствующие частым транскриптам.	1. Избыточное число циклов ПЦР.	1. Повторите ПЦР со свежей порцией первой цепи кДНК, уменьшив число циклов на 2—3. Анализ дц-кДНК из некоторых тканей (например, мозг, тимус, селезенка млекопитающих) может не выявлять ярких полос.
	2. Неправильные параметры электрофореза.	2. Степень визуализации дц-кДНК может зависеть от параметров гельэлектрофореза. Используйте следующие параметры: 1X ТАЕ буфер, концентрация агарозы 1.1% — 1.5%, рабочее напряжение не более 10 V/см (10 V на каждый см длины между электродами).
	3. Слишком продолжи- тельный этап элонгации при 72°С, приводящий к конкатамеризации адаптеров для кДНК.	3. Повторите синтез кДНК с измененными параметрами ПЦР, уменьшая продолжительность этапа элонгации при 72°С на 2 минуты.

12. Приложение А. Рекомендации к дальнейшей работе с полученной дц-кДНК

Перед сборкой библиотек кДНК рекомендуется провести нормализацию кДНК с помощью набора реактивов Trimmer-2 (кат. # NK003, Евроген). Нормализацию кДНК следует выполнять до дальнейшей работы с полученной дц-кДНК.

Адаптерные пары, использованные для синтеза кДНК	Применение	Рекомендации
PlugOligo-1 и CDS-1.	1. Получение кДНК библиотек для ненаправленного клонирования, секвенирование по Сэнгеру.	1. Векторы для ТА-клонирования могут быть использованы для ненаправленного клонирования библиотеки кДНК. Плазмидная ДНК, выделенная из индивидуальных колоний, может быть использована для секвенирования по Сэнгеру.
	2. Выделение полнораз- мерной кДНК, RACE.	2. См. инструкцию к набору Takara SMARTer $^{\text{TM}}$ RACE cDNA Amplification kit (Cat. # PT4096-1).
PlugOligo-3M и CDS-4M.	1. Получение кДНК библиотек для направленного клонирования.	1. См. приложение Б.
	2. Секвенирование на платформах SOLiD или Illumina.	2. См. приложение В.
	3. Секвенирование на платформе Roche/454.	3. См. приложение Г.
PlugOligo-1 и CDS-Gsu.	Секвенирование на платформе Roche/454.	См. приложение Д.

13. Приложение Б. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерам PlugOLigo-3M и CDS-4M, к направленному клонированию

Необходимые реагенты:

- ПЦР-продукты дц-кДНК (п. 10.2.2), фланкированные адаптерными последовательностями, содержащими асимметричные сайты Sfil A и Sfil B;
- эндонуклеаза рестрикции Sfil с 10X реакционным буфером;
- набор для очистки ДНК из реакционных смесей (например, Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген));
- колонки CHROMASPIN™-1000 или аналог опционально.

Обработка дц-кДНК эндонуклеазой рестрикции Sfil

1. Для каждого образца подготовьте реакционную смесь:

44 мкл ПЦР-продукт дц-кДНК; 5 мкл 10X реакционный буфер;

1 мкл Эндонуклеаза рестрикции Sfil (10-20 ед.).

- ▶ Если образцы ПЦР-продуктов дц-кДНК хранились при -20°С, перед отбором аликвот прогрейте пробирки при 65°С в течение 1 минуты и перемешайте их содержимое легким постукиванием. Остатки ПЦР-продукта дц-кДНК храните при -20°С.
- 2. Инкубируйте пробирки при 50 °C в течение 3 часов.
- 3. После обработки эндонуклеазой проведите очистку кДНК с помощью наборов Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген). Для элюции используйте 50 мкл воды для ПЦР.
- ▶ Для обогащения кДНК полноразмерными последовательностями выполните селекцию по размеру длинных молекул кДНК (>1350 пн) с использованием CHROMASPIN™-1000.

Полученная дц-кДНК может быть использована для направленного клонирования в векторы, содержащие асимметричные сайты Sfil A и Sfil B (например, pDNR-LIB или pTriplEx2 от Clontech), линеаризованные с помощью эндонуклеазы рестрикции Sfil.

14. Приложение В. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами PlugOligo-3M и CDS-4M, к секвенированию на платформах SOLiD или Illumina

Необходимые реагенты:

- ПЦР-продукты дц-кДНК (п. 10.2.2), фланкированные адаптерными последовательностями, содержащими асимметричные сайты Sfil A и Sfil B;
- эндонуклеаза рестрикции Sfil с 10X реакционным буфером;
- набор Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген);
- набор для очистки ДНК из реакционных смесей (например, Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген));
- вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
- реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле;
- маркер длин ДНК, 1 кб (например, DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген).

14.1. Амплификация дц-кДНК

1. Для каждого образца подготовьте реакционную смесь:

200 мклDeionized water, nuclease-free;25 мкл10X Encyclo buffer;5 мклdNTP mix;10 мклPCR primer M1;5 мклПЦР-продукт дц-кДНК;5 мкл50X Encyclo polymerase mix.

- ▶ Если образцы ПЦР-продуктов дц-кДНК хранились при −20°С, перед отбором аликвот прогрейте пробирки при 65°С в течение 1 минуты и перемешайте их содержимое легким постукиванием. Остатки ПЦР-продукта дц-кДНК храните при −20°С.
- 2. Перемешайте реакционную смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- 3. Разнесите по 50 мкл реакционной смеси в 5 пробирок для ПЦР.
- 4. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу амплификации:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
Денатурация		95°C	15 c
Отжиг	6 циклов	66°C	20 c
Элонгация		72°C	3 мин

- 5. После завершения ПЦР проведите гель-электрофорез с целью оценки качества и концентрации дц- кДНК. Нанесите 4 мкл каждого образца и 0.1 мкг 1 кб маркера на 1.5% (w/v) агарозный гель с бромистым этидием. Проводите электрофорез в 1X ТАЕ буфере.
- 6. Проведите очистку амплифицированной дц-кДНК с помощью наборов Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Eвроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген). Для элюции используйте 50 мкл воды деионизированной, свободной от нуклеаз.

14.2. Обработка дц-кДНК эндонуклеазой рестрикции Sfil

1. Для каждого образца подготовьте реакционную смесь:

44 мкл ПЦР-продукт дц-кДНК; 5 мкл 10X реакционный буфер;

1 мкл Эндонуклеаза рестрикции Sfil (10-20 ед.).

- ▶ Если образцы ПЦР-продуктов дц-кДНК хранились при −20°С, перед отбором аликвот прогрейте пробирки при 65°С в течение 1 минуты и перемешайте их содержимое легким постукиванием. Остатки ПЦР-продукта дц-кДНК храните при −20°С.
- 2. Инкубируйте пробирки при 50°C в течение 3 часов.
- 3. После обработки эндонуклеазой проведите очистку дц-кДНК с помощью наборов Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген). Для элюции используйте 50 мкл воды для ПЦР.

Полученная дц-кДНК может быть проанализирована на платформах ABI/SOLiD или Illumina/Solexa.

15. Приложение Г. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами PlugOligo-3M и CDS-4M, к секвенированию на платформе Roche 454

Необходимые реагенты:

- ПЦР-продукты дц-кДНК (п. 10.2.2), фланкированные адаптерными последовательностями, содержащими асимметричные сайты Sfil A и Sfil B;
- эндонуклеаза рестрикции Sfil с 10X реакционным буфером;
- набор Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген);
- набор для очистки ДНК из реакционных смесей (например, Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген));
- вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
- реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле;
- маркер длин ДНК, 1 кб (например, DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген).

Амплификация дц-кДНК

- 1. Смешайте 2 мкл ПЦР-продукта дц-кДНК, полученного в п. 10.2.2, с 78 мкл воды для ПЦР в пробирке объемом 0.2 мл. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- ▶ Если образцы ПЦР-продуктов дц-кДНК хранились при –20°С, перед отбором аликвот прогрейте пробирки при 65°С в течение 1 минуты и перемешайте их содержимое легким постукиванием. Остатки ПЦР-продукта дц-кДНК храните при –20°С.
- 2. Для каждого образца подготовьте реакционную смесь:

195 мкл	Deionized water, nuclease-free;
25 мкл	10X Encyclo buffer;
5 мкл	dNTP mix;
10 мкл	454 PCR primer mix;
10 мкл	ПЦР-продукт дц-кДНК, разведенный в 40 раз;
5 мкл	50X Encyclo polymerase mix.

- 3. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- 4. Разнесите по 50 мкл ПЦР-смеси в 5 пробирок для ПЦР.

5. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу амплификации:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
Денатурация		95°C	15 c
Отжиг	3 цикла	50°C	20 c
Элонгация		72°C	3 мин
Денатурация		95°C	15 c
Отжиг	11 циклов	63°C	20 c
Элонгация		72°C	3 мин

- 6. После завершения циклирования, с целью оценки качества и концентрации дц-кДНК, проведите электрофорез в агарозном геле. Нанесите 4 мкл каждого образца дц-кДНК и 0.1 мкг 1 кб маркера на 1.5% агарозный гель с бромистым этидием. Проводите электрофорез в 1X ТАЕ буфере. При необходимости, добавьте 1—3 дополнительных ПЦР-цикла 95 °C 15 сек, 63 °C 20 сек, 72 °C 3 мин.
- 7. Проведите очистку амплифицированной дц-кДНК с помощью наборов Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген). Для элюции используйте 50 мкл воды деионизированной, свободной от нуклеаз.

Полученная дц-кДНК может быть проанализирована на платформе Roche/454.

16. Приложение Д. Подготовка дц-кДНК, фланкированной адаптерами PlugOligo-1 и CDS-Gsu, к секвенированию на платформе Roche 454

Необходимые реагенты:

- ПЦР-продукты дц-кДНК (п. 10.2.2), фланкированные адаптерными последовательностями, содержащими асимметричные сайты Sfil A и Sfil B;
- эндонуклеаза рестрикции Sfil с 10X реакционным буфером;
- набор Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101, Евроген);
- набор для очистки ДНК из реакционных смесей (например, Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BCO41S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген));
- вода деионизированная, свободная от нуклеаз;
- реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле;
- маркер длин ДНК, 1 кб (например, DNA Ladder 1 kb (кат. # NLOO1, Евроген).

Амплификация дц-кДНК

1. Для каждого образца подготовьте реакционную смесь:

200 мкл Deionized water, nuclease-free: 25 мкл 10X Encyclo buffer;

5 мкл dNTP mix;

454 PCR primer mix: 10 мкл 10 мкл ПЦР-продукт дц-кДНК; 5 мкл 50X Encyclo polymerase mix.

- ▶ Если образцы ПЦР-продуктов дц-кДНК хранились при –20°С, перед отбором аликвот прогрейте пробирки при 65°C в течение 1 минуты и перемешайте их содержимое легким постукиванием. Остатки ПЦРпродукта дц-кДНК храните при -20°C.
- 2. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.
- 3. Разнесите по 50 мкл ПЦР-смеси в 5 пробирок для ПЦР.
- 4. Установите пробирки амплификатор. Запустите В программу амплификации:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин	
Денатурация		95°C	15 c	
Отжиг	6 циклов	66°C	20 c	
Элонгация		72°C	3 мин	

Полученная дц-кДНК может быть проанализирована на платформе Roche/454.

Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество	
	продукі		
BC022S	Cleanup Standard	50 реакций	
BC022L		250 реакций	
BC023S	Cleanup Mini	50 реакций	
BC023L	Стеаттир імітті	250 реакций	
BC025S	Cloonin St DCD	50 реакций	
BC025L	Cleanup St PCR	250 реакций	
BC032	Реагент ExtractRNA	на 100 выделений из 100 мг ткани	
BC034T	RNA Solo	10 реакций	
BC034S	KIVA SOIO	50 реакций	
BC041S	Cleanup C Can	50 реакций	
BC041L	Cleanup S-Cap	250 реакций	
EK005S	Ингибитор РНКаз RiboCare	50 реакций	
EK005M	ингиоитор Етпказ кіросаге	250 реакций	
NK003	Набор для нормализации кДНК Trimmer-2	10 реакций	
NL001	Маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb	40 мкг	
PB022	FOV TAT Sub on	100 мл	
PB122	50Х ТАЕ буфер	1 л	
PK101	Encyclo Plus PCR kit	200 реакций объемом 25 мкл	
PB207S		1.5 мл	
PB207M	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	50 мл	
PB207L	oboodium of hybridas	1л	

Наборы и сервисы Евроген

- Н▶▶> ссылка на страницуНАБОРА
- СЕРВИСА СТРАНИЦУ

```
Выделение и очистка нуклеиновых кислот В
Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ В
Синтез и амплификация кДНК В
Клонирование ДНК В
Выявление контаминации микоплазмой В
Оценка ДНК В
Н
Ормализация кДНК В
Практикум по генной инженерии В
Синтез олигонуклеотидов и зондов С
Секвенирование по Сэнгеру С
Синтез генов С
Н
Синтез генов С
Н
Ормализация кДНК В
```

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Сайт-направленный мутагенез

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

3A0 Евроген Москва 117997 ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15 Тел.: +7 (495) 784-7084 order@evrogen.ru www.evrogen.ru