

Набор PCR Control Set

Кат. # РК104

Версия 02 от 10 января 2018 г.

Набор PCR Control Set представляет собой систему положительного контроля ПЦР, которую можно использовать для проверки любых ДНК-полимераз с комплектным реакционным буфером.

Набор предназначен для:

- быстрой проверки функциональной активности полимеразы и реакционного буфера для ПЦР;
- проверки работы ПЦР-амплификатора (равномерность нагрева термоблока);
- оптимизации количества отдельных компонентов реакционной смеси и изучаемых добавок (например, при подборе концентрации интеркалирующего красителя или ионов магния).

Тест может быть выполнен на любом амплификаторе.

Набор рассчитан на 100 реакций объемом 25 мкл.

Только для научно-исследовательских целей.

Состав набора

Компоненты набора	Кол-во
Контрольная ДНК-матрица (5 пг/мкл)	100 мкл
Смесь праймеров для проведения контрольной реакции (5 мкМ каждого)	100 мкл
50X смесь dNTP (10 мкМ каждого)	50 мкл
Стерильная вода для ПЦР	2 x 1.8 мл

Транспортировка: при комнатной температуре.

Хранение: -20°C.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

Контрольная ДНК-матрица – амплифицированный фрагмент гена *GAPD* мыши, 5 пг/мкл, размер ампликона 237 п.о.

Структура контрольных праймеров:

праймер 1: 5'-GAGCTTCCCGTTCACTCTG-3'

праймер 2: 5'-GCATCCTGCACCACCAACTG-3'

► **ВНИМАНИЕ!**

Протокол не описывает подготовку отрицательного контроля ПЦР: реакции без добавления матрицы (NTC, no template control). NTC необходим для определения уровня контаминации реактивов и рабочего места продуктом ПЦР.

В большинстве случаев при разовой проверке функциональной активности фермента постановка NTC не обязательна.

Однако, если тест применяется часто и для анализа используется нанесение продукта ПЦР в агарозный гель, рекомендуется периодически контролировать уровень контаминации, включая в эксперимент реакцию NTC.

Протокол постановки контрольной реакции

Для выполнения теста необходимы дополнительные материалы, которые **не входят** в состав набора:

- ДНК-полимераза с реакционным буфером для ПЦР;
- При анализе в агарозном геле – маркер длин ДНК в диапазоне 100-1000 п.о (например, кат. # NL002, Евроген);
- При анализе методом ПЦР-РВ – SYBR Green I (например, кат. # РВ025, Евроген).

1. Приготовьте реакционную смесь для положительного контроля ПЦР в стерильной пробирке, используя компоненты набора, а также проверяемые компоненты: ДНК-полимеразу и прилагаемый реакционный буфер.

Если необходимо провести оптимизацию концентрации дополнительного компонента (изучаемая добавка), подготовьте в одной пробирке общую реакционную смесь без этого компонента (премикс), тщательно перемешайте премикс и разнесите по пробиркам; добавьте в каждую пробирку отдельно разное количество изучаемой добавки.

Для проверки работы термоблока необходимо приготовить общий премикс в одной пробирке, а затем разнести его по нескольким пробиркам для ПЦР (технические повторы). При амплификации пробирки следует расположить в разных зонах термоблока.

Для расчета основных компонентов в одной контрольной реакции используйте таблицу:

Название компонента	Анализ в агарозном геле	Анализ методом ПЦР-РВ
50X смесь dNTP	0.5 мкл	0.5 мкл
Смесь праймеров	1 мкл	1 мкл
Контрольная ДНК-матрица	1 мкл	1 мкл
Буфер, прилагаемый к полимеразе	X мкл*	X мкл*
Полимераза	Y мкл*	Y мкл*
Вода	до 25 мкл**	до 25 мкл**
50X SYBR Green I	–	0.5 мкл
100% DMSO	–	0.5-1 мкл***
Суммарный объем	25 мкл	25 мкл

* Воспользуйтесь инструкцией к полимеразе для определения необходимого количества данных компонентов в контрольной реакции.

** При смешивании компонентов вода добавляется в первую очередь, полимеразы в последнюю.

*** DMSO иногда входит в состав реакционных буферов для полимераз.

Информация по оптимизации концентрации DMSO и SYBR Green I приведена на сайте, см. <http://evrogen.ru/products/PCR-kits/SYBR-optimization.pdf>

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

Примечание: Если ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте в пробирку каплю стерильного минерального масла.

3. Условия амплификации:

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	1 мин
Денатурация	17 – для анализа в геле,	95°C	15 сек
Отжиг	30 – для анализа методом ПЦР-РВ*	62°C	15 сек
Элонгация		72°C	30 сек

* Для анализа методом ПЦР-РВ детекция флуоресценции в канале SYBR (FAM) на стадии отжига праймеров.

4а. Анализ в агарозном геле.

По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза в 1.5% (w/v) агарозе. Используйте маркер длин ДНК в диапазоне 100-1000 п.о.

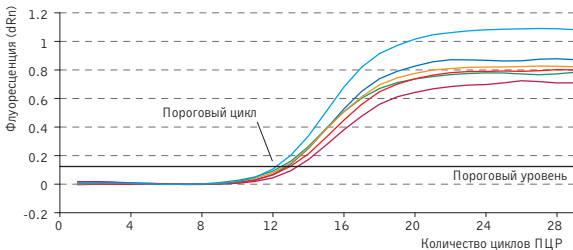
Если проверяемый фермент функционально активен в прилагаемом буфере, в геле наблюдается ПЦР-продукт размером 240 п.о. Отсутствие продукта свидетельствует о том, что ПЦР-система не работает: фермент потерял активность; буфер для ПЦР не оптимален, например, отсутствуют ионы магния; в системе могут содержаться ингибиторы ПЦР; возможна неисправность ПЦР-амплификатора.

4б. Анализ методом ПЦР-РВ

Если проверяемый фермент функционально активен в прилагаемом буфере, на графике развивается кривая флуоресценции, пороговый цикл (Ct) не превышает 20. В случае, если фермент потерял активность или буфер не оптимален, сигнал не развивается или значение Ct превышает 20.

При исправной работе термоблока сигнал во всех лунках должен совпадать по интенсивности, разброс между значениями Ct в технических повторях допускается не более 1 цикла.

На рисунке приведен пример тестирования набором PCR Control set различных полимераз методом ПЦР-РВ.



Результат амплификации в реальном времени контрольной ДНК-матрицы с использованием различных ДНК-полимераз (Евроген) и интеркалирующего красителя SYBR Green I. Голубая линия – готовая смесь qPCRMix-HS; синяя – HS Taq ДНК-полимераза; оранжевая – Encyclo полимераза; красная – SNPdetect полимераза; зеленая – Taq ДНК-полимераза; малиновая – Tersus полимераза.

- ▶ **ВНИМАНИЕ!** При использовании красителя SYBR Green I может происходить ингибирование реакции. В этом случае рекомендуется снижать концентрацию красителя и добавить 1-5% DMSO в реакционную смесь.

Продукты и услуги компании Евроген

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 геной 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, корп. 70 (Технопарк ИБХ)

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru

order@evrogen.ru