

SNPdetect полимераза

Кат. ## PK022S, PK022L

Версия 3 от 2 февраля 2024 г.

SNPdetect — термостабильная высокоточная ДНК-полимераза с «горячим стартом», лишена экзонуклеазной активности.

SNPdetect используется для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и специфичной амплификации фрагментов ДНК длиной до 1 000 п.о.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Кат. #	Кол-во р-ций по 25 мкл	Состав
PK022S	200	50X SNPdetect Polymerase, 100 µl 10X SNPdetect buffer (Mg free), 600 µl MgCl ₂ (50 mM), 300 µl
PK022L	1 000	50X SNPdetect Polymerase, 500 µl (5 x 100 µl) 10X SNPdetect buffer (Mg free), 3 ml (5 x 600 µl) MgCl ₂ (50 mM), 1.5 ml (5 x 300 µl)

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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

Область применения

- SNP генотипирование: аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель-специфичное удлинение праймера (AS-PEX).
- Высокоспецифичная ПЦР, в том числе мультиплексная ПЦР.
- ПЦР-РВ с изменением конформации зондов без его разрушения, например, технологии Scorpion, Amplifluor, LUX и др.
- HRM, плавление с использованием меченных и немеченных зондов.
- ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями.

Ограничения к использованию

- SNPdetect полимеразу нельзя использовать для технологии TaqMan, где разгорание зонда происходит в результате 5'→3' экзонуклеазной активности полимеразы. Для решения таких задач рекомендуется использовать HS-Taq ДНК-полимеразу (кат. ## PK017S/L/H/B, PK018, Евроген).

Основные характеристики

- Высокая точность синтеза ДНК из дезокси- и дидезоксинуклеотидов.
- Высокая специфичность, низкая фоновая амплификация.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (95 °С).
- Температурный оптимум активности: 70–74 °С.
- Отсутствует 5'→3' экзонуклеазная активность и 3'→5' экзонуклеазная активность (корректирующая).
- Длина амплифицируемых фрагментов до 1 т.п.о.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор.

Протокол

► При постановке ПЦР соблюдайте зонирование помещений. Разделите зоны для приготовления реакционной смеси, внесения ДНК-матрицы, проведения ПЦР и анализа ПЦР-продукта.

1. Разморозьте при комнатной температуре все компоненты для ПЦР, кроме полимеразы. Перемешайте их содержимое на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

2. Приготовьте реакционную смесь:

- рекомендуемый объем реакции — 25 мкл;
- для избежания погрешности дозаторов и дополнительных разведений компонентов реакции рекомендуется рассчитывать реакционную смесь минимум на 4 образца;
- 10X SNPdetect buffer не содержит ионы Mg^{2+} , в состав набора входит 50 мМ раствор $MgCl_2$. Рекомендуемая концентрация ионов Mg^{2+} в 1X реакционной смеси — 2.5 мМ (допустимо оптимизировать концентрацию ионов в диапазоне от 2 до 4 мМ).

Расчетные количества ионов магния для реакционной смеси объемом 25 мкл:

Добавляемый объем 50 мМ $MgCl_2$	1.0	1.1	1.25	1.35	1.5	1.75	2.0
Конечная концентрация Mg^{2+}	2.0	2.2	2.5	2.7	3.0	3.5	4.0

– предварительно рассчитайте количество ДНК-матрицы (см. п. 5).

Компонент	Количество для реакции объемом 25 мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл (необходимо учесть объем ДНК-матрицы)
10X SNPdetect buffer (Mg free)	2.5 мкл
MgCl ₂ (50 мМ)	1–2 мкл
DMSO*	5%
Праймер 1 (10 мкМ)	0.25–1 мкл**
Праймер 2 (10 мкМ)	0.25–1 мкл
Зонд (10 мкМ) или Интеркалирующий краситель (50X) (опционально)	0.25–1 мкл 0.5 мкл
dNTP (10 мМ каждого)***	0.5 мкл
SNPdetect Polymerase	0.25–0.5 мкл

* Добавление DMSO снижает специфичность реакции, поэтому его добавление в реакцию до концентрации 5% возможно только в случае амплификации GC-богатых фрагментов. При этом температура отжига праймеров снизится на 2–3 °С. Рекомендуется контролировать специфичность амплификации плавлением или гель-электрофорезом.

** Для получения наилучших результатов амплификации концентрацию праймеров в реакции рекомендуется подбирать индивидуально. Для аллель-специфичных праймеров рекомендуется использовать пониженные концентрации (0.1–0.2 мкМ в реакционной смеси) — это повысит качество дискриминации аллельных вариантов.

*** Рекомендуется использовать смесь dNTP (10 мМ каждого) (кат. ## PBO06S/L, Евроген).

3. Аккуратно перемешайте реакционную смесь на вихре, сбросьте капли кратким центрифугированием.

4. Разнесите реакционную смесь в пробирки для ПЦР.

5. Внесите необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР. 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.

Тип матрицы	Оптимальное количество
Плазмидная ДНК или амплифицированная ДНК	до 10 пг
Геномная ДНК или первая цепь кДНК	до 100 нг*

* Повышенное количество матрицы в реакции не снижает специфичность амплификации, но увеличивает ее выход.

6. При использовании амплификатора без нагревающейся крышки наложите поверх реакционной смеси минеральное масло.

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

Предварительная денатурация	95 °С	1– 3 мин
	95 °С	5 с – 1 мин
Циклы ПЦР (15–50)	Tm (55–68 °С)	5 с – 1 мин
	72 °С	зависит от длины ПЦР-фрагмента (1 мин на 1 т.п.о.)

- Рекомендуется минимизировать количество циклов ПЦР, так как их избыточное количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.
- Аллель-специфичную ПЦР рекомендуется проводить в режиме реального времени. Также в ПЦР можно включить стадию плавления ПЦР-продукта. Разница значений порогового цикла (Ct) для реакций с разными аллель-специфичными праймерами свидетельствует о наличии или отсутствии в матрице SNP (см. Рисунок 1).

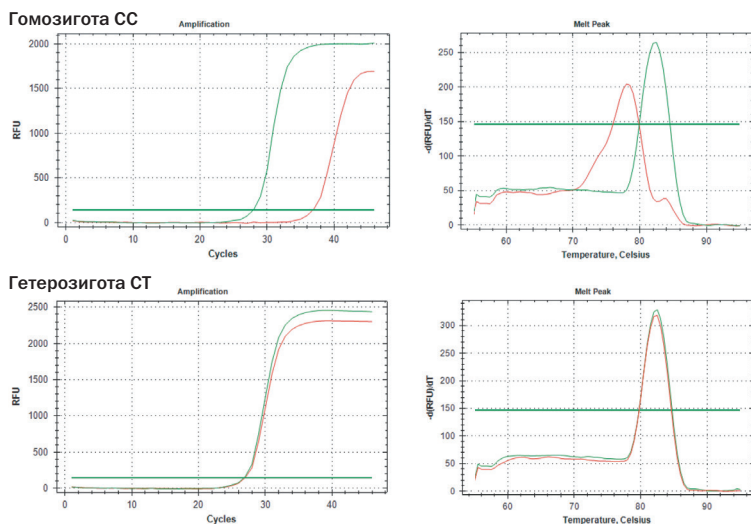


Рисунок 1 – аллель-специфичная ПЦР с использованием SNPdetect полимеразы.

Анализ полиморфизма (С/Т) в человеческом гене LCT:

Праймер 1 («С» на 3'-конце) — зеленые линии;

праймер 2 («Т» на 3'-конце) — красные линии.

На старте использовано 5 нг геномной ДНК, интеркалирующий краситель SYBR Green I.

ЗАО Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15

Тел.: +7 (495) 784-7084

order@evrogen.ru

www.evrogen.ru