

SNPdetect полимеразы

Версия 2 от 16 сентября 2019 г.

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

Рекомендуется для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и для специфичной амплификации фрагментов ДНК длиной до 1000 п.о. с широкого спектра матриц. Допустимо использование в реал-тайм приложениях.

Область применения

- **SNP генотипирование:** аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель-специфичное удлинение праймера (AS-PEX), минисеквенирование;
- Высокоспецифичная ПЦР, в том числе мультиплексная ПЦР;
- Высокоточная амплификация фрагментов до 1000 п.о. с возможностью клонирования продуктов ПЦР в T-векторы (pAL2-T или pKAN-T);
- ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей (SYBR Green I, EvaGreen);
- ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных зондов или праймеров по технологиям Scorpion, Amplifluor, LUX и другим, основанным на изменении конформации зонда без его разрушения;
- Плавление с использованием меченых и немеченых зондов, HRM плавление ампликонов.

Кат. #	Кол-во	Состав
PK022S	200 р-ций по 25 мкл	SNPdetect полимеразы, 10 ед/мкл, 100 мкл 10X SNPdetect буфер (без Mg ²⁺), 600 мкл 50 мМ MgCl ₂ , водный раствор, 300 мкл

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки — 12 месяцев со дня поставки.

Основные свойства фермента:

- Отсутствие экзонуклеазной активности (5' → 3' и 3' → 5')
- «Горячий старт», обеспеченный специфичными антителами
- Высокая точность синтеза ДНК из дезокси- и дидезоксинуклеотидов
- Высокая специфичность, низкая фоновая амплификация
- Синтез фрагментов до 1000 п.о.
- Терминальная трансферазная активность (нематрично присоединяет дезоксиаденозин к 3'-концу ПЦР-продукта)

Ограничения к использованию

- SNPdetect полимеразы нельзя использовать для технологии TaqMan, где разгорание зонда происходит в результате 5' → 3' экзонуклеазной активности полимеразы.

Приготовление реакционной смеси

Компонент	Конечная концентрация в реакционной смеси	Объем компонента на 1 реакцию объемом 25 мкл
10X буфер для амплификации без Mg ²⁺	1X	2.5 мкл
MgCl ₂ (50 мМ)	2.5–3.5 мМ	1.25–1.75 мкл
Смесь dNTP	0.2 мМ каждого	зависит от концентрации компонента
Праймеры	0.1–0.4 мкМ	
ДНК-матрица	≤ 100 нг/ реакцию	
Интеркалирующий краситель (опционально)	1X	
SNPdetect полимеразы (10 ед/мкл)	0.1–0.2 ед/мкл	0.25–0.5 мкл
Стерильная вода	–	до 25 мкл

Оптимизация концентрации ионов Mg²⁺

10X SNPdetect буфер не содержит ионы магния.

Для оптимизации концентрации ионов магния в реакционной смеси используйте прилагаемый 50 мМ раствор MgCl₂. При концентрации 2.5 мМ, как правило, достигается наиболее эффективная дискриминация аллелей. Поскольку магний является кофактором полимеразы, увеличение концентрации ионов Mg²⁺ увеличивает выход реакции. Однако, одновременно снижается её специфичность и растет неспецифическая (фоновая) амплификация.

В таблице приведен расчет объема добавляемого раствора 50 мМ MgCl₂ для получения соответствующей концентрации ионов магния в реакционной смеси:

Конечная концентрация ионов магния в реакционной смеси (мМ)	2.0	2.2	2.5	2.7	3.0	3.5	4.0
Добавляемый объем 50 мМ MgCl ₂ в 25 мкл реакционной смеси (мкл)	1.0	1.1	1.25	1.35	1.5	1.75	2.0

Смесь dNTP

Рекомендуемая конечная концентрация в реакционной смеси — 0.2 мМ каждого нуклеотида. Не рекомендуется ее превышать, поскольку это может снизить специфичность реакции.

Праймеры

Для получения наилучших результатов амплификации концентрацию праймеров в реакции рекомендуется подобрать индивидуально.

Для **аллель-специфичных праймеров** рекомендуем использовать пониженные концентрации (0.1–0.2 мкМ в реакционной смеси) — это повысит качество дискриминации аллельных вариантов.

ДНК-матрица

Количество ДНК-матрицы, необходимой для успешной амплификации, зависит от качества ДНК, структуры, количества копий, GC-состава ампликона и пр.

Рекомендуемое количество ДНК-матрицы для проведения ПЦР в объеме 25 мкл составляет:

- До 10 пг — для плазмидной ДНК или амплифицированной ДНК;
- До 100 нг — для геномной ДНК или первой цепи кДНК.

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

Интеркалирующий краситель

В ряде случаев интеркалирующие красители ингибируют реакцию. В этом случае рекомендуется снизить концентрацию красителя в реакционной смеси в 1.25–1.5 раза. Уровень флуоресцентного сигнала при этом снижается, но также уменьшается эффект ингибирования и возрастает специфичность реакции.

DMSO

Добавление DMSO снижает специфичность реакции с SNPdetect полимеразой, 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 электрофоретическим анализом.

SNPdetect полимеразы

Фермент имеет «горячий старт», обеспеченный моноклональными антителами, и неактивен при комнатной температуре. Активация фермента происходит в первом цикле денатурации. Для реакции объемом 25 мкл обычно необходимо 2.5–5 единиц фермента.

Параметры ПЦР

Для аллель-специфичной ПЦР важно подобрать параметры реакции для каждой группы аллель-специфичных праймеров.

Общие рекомендации по параметрам ПЦР приведены в таблице:

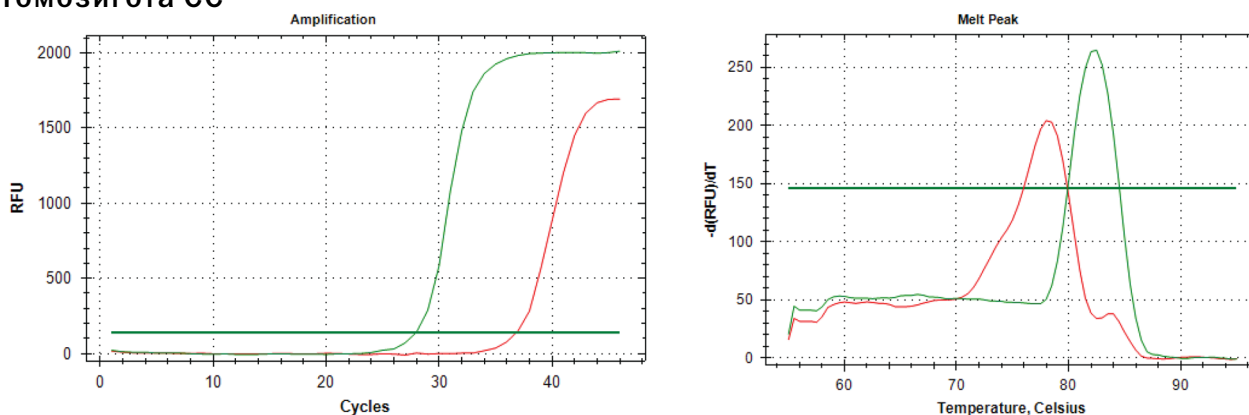
Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95 °С	1–3 мин
Денатурация		95 °С	5 с – 1 мин
Отжиг	15–50	Tm (55–68 °С)	5 с – 1 мин
Элонгация		72 °С	1 мин на 1 т.п.о.

Рекомендации по режиму амплификации

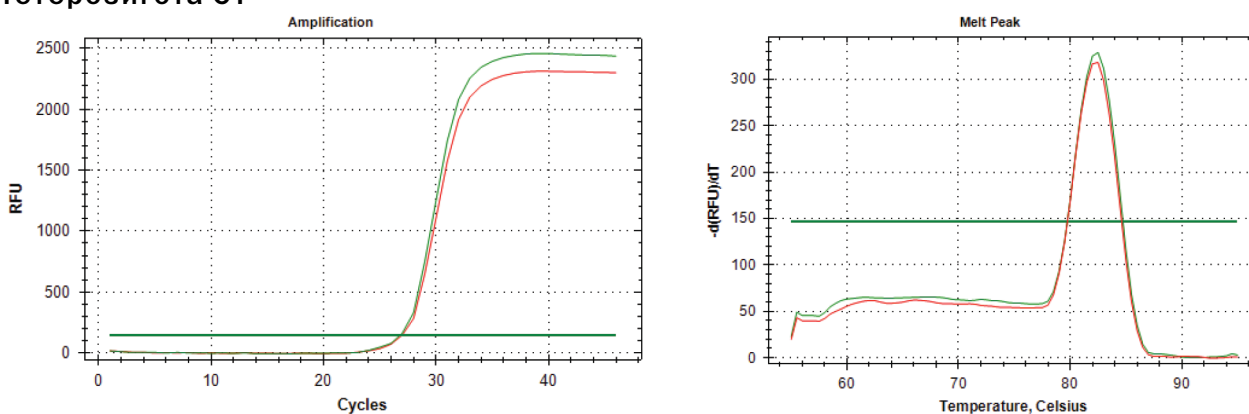
- Предварительная денатурация в течение 2–3 мин рекомендуется для геномной ДНК. В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0.5–1 мин.
- Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета температуры отжига (Tm) можно воспользоваться формулой:
$$Tm (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$
Оптимальная температура отжига праймеров может отличаться от расчетной. Рекомендуем точно определить ее, используя градиент температур. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов (Tm + 5 °С) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.
- Метод детекции в агарозном геле по окончании реакции («по конечной точке») требует оптимизации количества циклов ПЦР. Для каждой группы аллель-специфичных праймеров необходимо подобрать такие условия, при которых происходит эффективная амплификация с полностью комплементарного праймера, а реакция с частично некомплементарного праймера не успевает перейти в экспоненциальную фазу.

- Аллель-специфичную амплификацию удобнее проводить на приборах для ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем (например, SYBR Green I). Разница значений порогового цикла Ct (threshold cycle) для реакций с разными аллель-специфичными праймерами свидетельствует о наличии или отсутствии в матрице SNP (см. рисунок).

Гомозигота СС



Гетерозигота СТ



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.

Клонирование ПЦР-продуктов в Т-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в Т-векторы (pAL2-T или pKAN-T) благодаря выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам. Для клонирования нужно использовать свежеприготовленный ПЦР-продукт. Сразу после окончания амплификации пробирку с продуктом ПЦР следует поместить в лед.

Рекомендуем провести очистку ДНК, так как использование неочищенного ПЦР-продукта сильно снижает эффективность клонирования. Очистку можно провести на колонках, на магнитных частицах или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением.

В реакцию лигирования рекомендуется взять 100–200 нг ПЦР-продукта.

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус 15
Тел.: +7 (495) 988-4083
Факс: +7 (495) 988-4085
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru