



Tersus Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу РК121

Инструкция по применению

Набор реактивов Tersus Plus PCR kit предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Версия 2 от 26 ноября 2020 г.

Содержание

I.	Состав и условия хранения	2
II.	Описание продукта	2
II.1.	Tersus полимераза	2
II.2.	Буферы	3
III.	Особенности использования Tersus полимеразы	4
III.1.	Автоматический "горячий старт"	4
III.2.	Протокол	4
IV.	Решение проблем	5
IV.1.	Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции	5
IV.2.	Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле	6

I. Состав и условия хранения

Компонент	Количество
50X смесь полимераз Tersus	100 мкл
10X Tersus Plus буфер	600 мкл
5X Tersus Red буфер	1.2 мл
2X Tersus GC буфер	3 мл (2 x 1.5 мл)
50X смесь dNTP (10 мМ каждого)	120 мкл
Вода для ПЦР	4.5 мл (3 x 1.5 мл)

Хранение: хранить при -20°C.

При соблюдении условий хранения и транспортировки срок хранения 1 год.

II. Описание продукта

Набор реактивов "**Tersus Plus PCR kit**" содержит все необходимые компоненты для постановки 200 стандартных ПЦР амплификаций объемом 25 мкл. В состав набора входят **три реакционных буфера**, использование которых расширяет сферу применения фермента и облегчает работу по оптимизации условий реакции.

II.1. Tersus полимеразы

Tersus полимеразы — специально разработанная смесь термостабильных ДНК полимераз с «горячим стартом» для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц. Свойства Tersus полимеразы:

- Высокоточная 5'>3' ДНК полимеразная активность
- Корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность
- Автоматический "горячий старт"
- Высокая специфичность
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в T-вектора

II.2. Буферы

Концентрация магния в 1X реакционном буфере 2.5 мМ.

1. 10X Tersus Plus буфер подходит для большинства приложений, может быть использован для проведения ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I, Eva Green.

2. 5X Tersus Red буфер содержит красный и желтый красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель. Буфер удобно использовать для постановки реакций, продукты которых впоследствии анализируются с помощью гель-электрофореза. Продукт ПЦР сразу наносится в гель без добавления буфера для нанесения проб. В 1% агарозном геле с 1X TAE буфером электрофоретическая подвижность красного красителя соответствует фрагменту ДНК размером 1000 п.о., желтый краситель мигрирует с фронтом на уровне фрагментов 20–30 п.о.

3. 2X Tersus GC буфер рекомендуется для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (>65 % GC). При замораживании в 2X Tersus GC буфере может образовываться осадок. В этом случае перед применением буфер следует прогреть на 50 °С до полного растворения осадка и перемешать на вортексе.

При использовании Tersus GC буфера следует внести следующие изменения в стандартную программу ПЦР:

- 1) увеличить продолжительность предварительной денатурации до 2 мин;
- 2) уменьшить температуру отжига праймера T_m на 2–5 °С относительно расчетной величины;
- 3) увеличить количество циклов ПЦР на 2–7.

III. Особенности использования Tersus полимеразы

III.1. Автоматический "горячий старт"

Tersus полимеразы содержат антитела, блокирующие ее активность при комнатной температуре. Фермент активируется только после прогревания реакционной смеси.

III.2. Протокол

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Компонент*	Реакция с Tersus Plus буфером	Реакция с Tersus Red буфером	Реакция с Tersus GC буфером	Конечная концентр. компонента
Вода для ПЦР	до 25 мкл	до 25 мкл	до 25 мкл	—
10X Tersus Plus буфер	2.5 мкл	—	—	1X
5X Tersus Red буфер	—	5 мкл	—	1X
2X Tersus GC буфер**	—	—	12.5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	0.2 мМ каждого
PCR-праймер 1	переменный	переменный	переменный	0.2–0.5 мкМ
PCR-праймер 2	переменный	переменный	переменный	0.2–0.5 мкМ
ДНК-матрица	переменный	переменный	переменный	1 пг – 200 нг на реакцию
50X Tersus полимеразы	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл	1X
Конечный объем	25 мкл	25 мкл	25 мкл	—

* Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

** Прогреть перед использованием до полного растворения осадка.

IV. Решение проблем

Приведенные ниже рекомендации могут быть использованы при решении проблем для большинства ПЦР приложений. Однако мы не можем гарантировать, что они применимы для всех приложений ПЦР, в которых может быть использован "Tersus Plus PCR kit".

IV.1. Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Какой-либо компонент не был добавлен или испортился в процессе хранения	Проверьте правильность приготовления реакционной смеси. Повторите реакцию, используя в качестве контроля праймеры и матрицу из набора PCR Control set (кат. # РК104). Если вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: customer-support@evrogen.ru
Недостаточное число циклов ПЦР	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3–5 циклов каждый раз.
Неправильно подобранная температура отжига праймеров или время отжига	Поставьте несколько реакций с разной температурой отжига или используйте температурный градиент. Увеличьте время отжига на 3–4 сек.
Слишком короткое время элонгации	Постепенно увеличивайте время элонгации с шагом 30 сек.
Неудачная структура праймера	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
Фрагмент ДНК содержит высокий процент GC оснований	Используйте 2X Tersus GC буфер для амплификации фрагмента ДНК. При постановке реакции следуйте указаниям из п. II.2. инструкции.
Слишком низкая или высокая концентрация ДНК-матрицы	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
ДНК-матрица низкого качества	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.
ДНК-матрица содержит ингибирующие ПЦР добавки	Проведите очистку ДНК-матрицы.
Недостаточно полимеразы	В редких случаях выход продукта ПЦР может быть увеличен путем увеличения концентрации полимеразы в реакционной смеси. Однако увеличение концентрации полимеразы более чем в два раза может привести к значительной фоновой амплификации.
Буфер, в котором растворена ДНК, имеет высокую концентрацию ЭДТА	Если концентрация ЭДТА в образце ДНК-матрицы превышает 5 мМ, это может отрицательно сказаться на эффективности ПЦР, поскольку происходит связывание ионов Mg^{2+} в реакционном буфере.

IV.2. Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Избыточное количество циклов ПЦР	Повторите реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта на более ранних циклах.
Слишком низкая температура отжига	Постепенно повышайте температуру отжига с шагом 2–3 °С или используйте температурный градиент.
Неудачная структура праймера	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов.	Оптимизируйте условия реакции, используя 2X Tersus GC буфер. При постановке реакции следуйте указаниям из пп. II.2. данной инструкции.
Контаминация посторонней ДНК-матрицей	Контролируйте уровень контаминации компонентов ПЦР, автоматических пипеток и пробирок с помощью негативного контроля ДНК-матрицы. В случае обнаружения контаминации замените загрязненный реактив и проведите очистку помещений и пипеток. При ПЦР с бактериальных колоний или фаговых бляшек невозможность изолировать отдельную колонию или бляшку может быть причиной множества полос.
Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
Избыток полимеразы	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию Tersus полимеразы.

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 генной 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

P▶▶▶ – ссылка на страницу
ПРОДУКТА

S▶▶▶ – ссылка на страницу
УСЛУГИ

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. 15
Тел.: +7 (495) 988-4083
Факс: +7 (495) 988-4085
www.evrogen.ru