



Tersus Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу РК221

Инструкция по применению

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

Версия 3 от 16 августа 2023 г.

Содержание

1. Состав и условия хранения	2
2. Описание продукта	2
2.1. Tersus полимераза	2
2.2. Буферы	3
3. Особенности использования Tersus полимеразы	4
3.1. Быстрый "горячий старт"	4
3.2. Протокол	4
4. Решение проблем	5
4.1. Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции	5
4.2. Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле	6

1. 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
50X смесь dNTP (10 мМ каждого)	120 мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	4.5 мл (3 x 1.5 мл)

Хранение: хранить при -20 °С.

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

2. 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 **два реакционных буфера**, использование которых расширяет сферу применения фермента и облегчает работу по оптимизации условий реакции.

2.1. 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:

- Высокая точность синтеза.
- 5' → 3' ДНК-полимеразная активность (до 10 т.п.н.).
- Отсутствие 5' → 3' экзонуклеазной активности.
- Корректирующая 3' → 5' экзонуклеазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (5–10 сек, 95 °С).
- Высокая специфичность амплификации.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор.

2.2. 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.

Рекомендуется для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC). При этом следует внести следующие изменения в стандартную программу ПЦР:

- 1) увеличить продолжительность предварительной денатурации до 2 мин;
- 2) увеличить количество циклов ПЦР на 2–7.

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. Особенности использования Tersus полимеразы

3.1. Быстрый "горячий старт"

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

3.2. Протокол

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР

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

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

4. 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".

4.1. 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 и повторите реакцию. Если вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: 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 10X Tersus Plus 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.
ДНК-матрица низкого качества	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.

продолжение на следующей странице

4 Решение проблем

Возможная причина проблемы	Варианты решения
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.

4.2. 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.
Сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов.	Оптимизируйте условия реакции, используя 10X Tersus Plus буфер. При постановке реакции следуйте указаниям из пп. II.2. данной инструкции.





продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
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.

Для заметок







Наборы и сервисы Евроген







    – ссылка на страницу НАБОРА




    – ссылка на страницу СЕРВИСА




Выделение и очистка нуклеиновых кислот   




Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ   



Синтез и амплификация кДНК      

Клонирование ДНК      

Выявление контаминации микоплазмой   




Оценка ДНК   



Нормализация кДНК      

Практикум по генной инженерии   

Генотипирование   

Синтез олигонуклеотидов и зондов   

Секвенирование по Сэнгеру   

Синтез генов   

Сайт-направленный мутагенез   

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

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

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