

Tersus Plus PCR kit

Набор реактивов

Номер по каталогу:
PK221 — на 200 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Область применения.....	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Количество реакций	4
6. Основные характеристики	5
7. Протокол	5
8. Возможные проблемы и способы их решения.....	8

1. Назначение

Набор содержит все необходимые компоненты для постановки ПЦР: Tersus полимеразу, два реакционных буфера, использование которых расширяет сферу применения фермента и облегчает работу по оптимизации условий реакции, dNTP и воду, свободную от нуклеаз.

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

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Область применения

- Амплификация фрагментов ДНК до 10 т.п.о.
- Амплификация фрагментов ДНК для переклонирования.
- Сайт-направленный мутагенез.
- Амплификации ДНК-фрагментов для дальнейшего секвенирования.
- Высокоспецифичная ПЦР со сложных ДНК матриц.
- ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями (SYBR Green I и др.).

3. Состав

Компонент	Количество
50X Tersus polymerase mix	100 мкл
10X Tersus Plus buffer	600 мкл
5X Tersus Red buffer	1.2 мл
dNTP mix (10 mM each)	120 мкл
Deionized water, nuclease-free	4.5 мл (3 x 1.5 мл)

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 200 реакций по 25 мкл.

6. Основные характеристики

- Высокая точность синтеза.
- Температурный оптимум активности: 70–74 °С.
- 5' → 3' ДНК-полимеразная активность.
- Отсутствие 5' → 3' экзонуклеазной активности.
- Корректирующая 3' → 5' экзонуклеазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации.
- Высокая специфичность амплификации.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-векторы.

7. Протокол

► При постановке ПЦР соблюдайте зонирование помещений. Разделяйте 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.

► При обнаружении осадка в 10X Tersus Plus buffer, прогрейте буфер при +37 °С до полного растворения осадка.

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;
- в процессе работы все компоненты и пробирку с реакционной смесью держите во льду или в охлажденном штативе;
- предварительно выберите реакционный буфер:

10X Tersus Plus buffer содержит ионы Mg^{2+} в концентрации 25 мМ (в однократной ПЦР-смеси концентрация магния составляет 2.5 мМ). Если необходимо оптимизировать количество магния в ПЦР-смеси, рекомендуется использовать буфер без Mg^{2+} (кат. #PB017, Евроген) и 50 мМ раствор $MgCl_2$ (кат. #PB005, Евроген). Допустимо оптимизировать концентрацию Mg^{2+} в диапазоне от 1.5 до 4 мМ.

Для амплификации ДНК богатой GC-участками (>65% GC) рекомендуется добавлять DMSO (2–5%) и/или бетаин (до концентрации 0.5–2М в реакционной смеси).

Чтобы получить ПЦР-продукт для анализа на агарозном геле без добавления специального буфера для нанесения проб воспользуйтесь 5X Tersus Red буфером.

Компонент	Количество для реакции объемом 25 мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл (необходимо учесть объем ДНК-матрицы)
Буфер	2.5–5 мкл (в зависимости от кратности буфера)
Праймер 1 (10 мкМ)	0.5–1.25 мкл
Праймер 2 (10 мкМ)	0.5–1.25 мкл
dNTP (10 мМ каждого)	0.5 мкл
50X Tersus polymerase mix	0.5 мкл

3. Аккуратно перемешайте реакционную смесь на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.
4. Разнесите реакционную смесь в пробирки для ПЦР.
5. Внесите необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР.
6. При использовании амплификатора без нагревающейся крышки, наложите поверх реакционной смеси минеральное масло.
7. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	92–95 °С	1–3 мин
Циклы ПЦР (оптимизировать)	92–95 °С	5 с – 1 мин
	Tm* (55–68 °С)	5 с – 1 мин
	72 °С	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	72 °С	2–10 мин

* Tm – температура отжига праймера.

** Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК).

- Рекомендуется минимизировать количество циклов ПЦР, так как их избыточное количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.
- Скорость элонгации 1–1.5 т.п.о. в минуту. Режим амплификации может отличаться для разных моделей термоциклеров.
- Для работы со сложными фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC) следует внести следующие изменения в стандартную программу ПЦР:
 - увеличить продолжительность предварительной денатурации до 5 минут;
 - увеличить температуру денатурации до 98 °С;
 - увеличить количество циклов ПЦР на 2–7.

8. Возможные проблемы и способы их решения

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.

8.1 Отсутствие продукта ПЦР или низкий выход реакции

Возможная причина	Способ решения
1. 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 .
2. Недостаточное число циклов ПЦР.	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3–5 циклов каждый раз.
3. Неправильно подобранная температура или время отжига праймеров.	Поставьте несколько реакций с разной температурой отжига или используйте температурный градиент. Увеличьте время отжига на 3–4 секунды.
4. Слишком короткое время элонгации.	Постепенно увеличивайте время элонгации с шагом 30 с.
5. Неудачная структура праймера.	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
6. Фрагмент ДНК содержит высокий процент GC оснований.	Используйте 10X Tersus Plus буфер для амплификации фрагмента ДНК.
7. Слишком низкая или высокая концентрация ДНК-матрицы.	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
8. ДНК-матрица низкого качества.	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.
9. ДНК-матрица содержит ингибирующие ПЦР добавки.	Проведите очистку ДНК-матрицы.
10. 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.
11. 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.

8.2 Продукт ПЦР выглядит как много полос или шмер при анализе на агарозном геле

Возможная причина	Способ решения
1. Избыточное количество циклов ПЦР.	Повторите реакцию, контролируя появление ПЦР-продукта на более ранних циклах.
2. Слишком низкая температура отжига.	Постепенно повышайте температуру отжига с шагом 2–3 °C или используйте температурный градиент.
3. Неудачная структура праймера.	Проверьте соответствие структуры праймеров и последовательности ДНК. Убедитесь, что праймеры не образуют комплементарные структуры, особенно в 3'-концевых областях.
4. Сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов.	Оптимизируйте условия реакции, используя 10X Tersus Plus буфер.
5. 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.
6. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы.	Сделайте серию последовательных разведений матрицы.
7. Избыток полимеразы.	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию Tersus полимеразы.

Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [Н](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [Н](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [Н](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [Н](#)▶▶▶ [С](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [Н](#)▶▶▶

Оценка ДНК [Н](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [Н](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [Н](#)▶▶▶

Генотипирование [Н](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [С](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [С](#)▶▶▶

Синтез генов [С](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [С](#)▶▶▶

[Н](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
НАБОРА

[С](#)▶▶▶ – ссылка на страницу
СЕРВИСА

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