

Оптимизация ПЦР при использовании SYBR Green I

Для некоторых реакций может потребоваться дополнительная оптимизация условий. Оптимизацию следует проводить только в тех случаях, когда при амплификации образуется не только специфический продукт (или специфический продукт не образуется вовсе). Ниже приведены приемы, которые могут улучшить показатели реакции.

ВНИМАНИЕ: ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ ПЦР С SYBR GREEN I ВСЕГДА НЕОБХОДИМО СРАВНИВАТЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ЦЕЛЕВОЙ РЕАКЦИИ И КОНТРОЛЬНОЙ РЕАКЦИИ БЕЗ МАТРИЦЫ (NTC).

1. Использование полимеразы с горячим стартом снижает уровень неспецифической амплификации.
2. Подбор оптимальной температуры отжига праймеров увеличивает эффективность и специфичность амплификации. Наилучшим образом его можно выполнить, используя градиент температур в амплификаторе. При повышении температуры отжига праймера общий выход ПЦР может снизиться за счет уменьшения неспецифической амплификации.

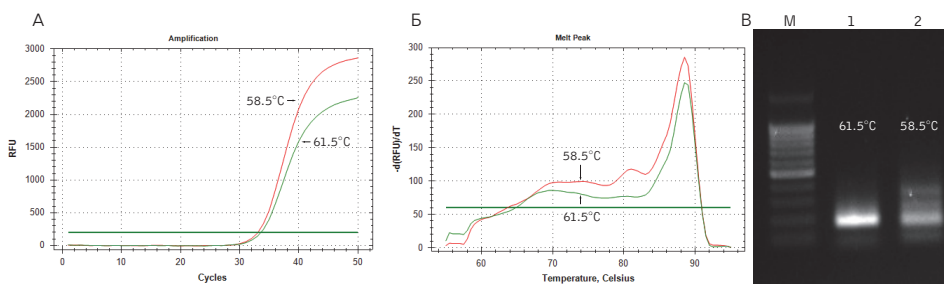


Рис. 1. Амплификация фрагмента геномной ДНК (180 п.о.) с разной температурой отжига праймера

Анализ кривой плавления и электрофорез продукта ПЦР на агарозном геле показывают, что при температуре отжига 58.5°C (красный цвет, дорожка 2) образуется в том числе и неспецифический продукт. При температуре 61.5°C (зеленый цвет, дорожка 1) образуется преимущественно специфический продукт.

- A: кривые амплификации;
B: кривые плавления;
B: продукт ампликации на агарозном геле:
дорожка 1 – 61.5°C,
дорожка 2 – 58.5°C,
маркер 100+ bp DNA Ladder (NL002, Евrogen).

3. Подбор структур праймеров, не образующих димеры. Для анализа структуры праймеров можно воспользоваться любой из онлайн-программ.
4. Оптимизация концентрации интеркалирующего красителя.

Раствор SYBR Green I можно использовать в более широком диапазоне концентраций: от 25X до 100X.

При повышении концентрации в реакции интенсивность флуоресценции возрастает, однако SYBR Green I может оказывать ингибирующее влияние на ПЦР, а также влиять на ее специфичность. (см. рисунок 2).

При понижении концентрации SYBR Green I наблюдается низкая интенсивность флуоресценции, однако при этом уменьшается вероятность образования неспецифических продуктов. Результаты ПЦР получаются более воспроизводимыми.

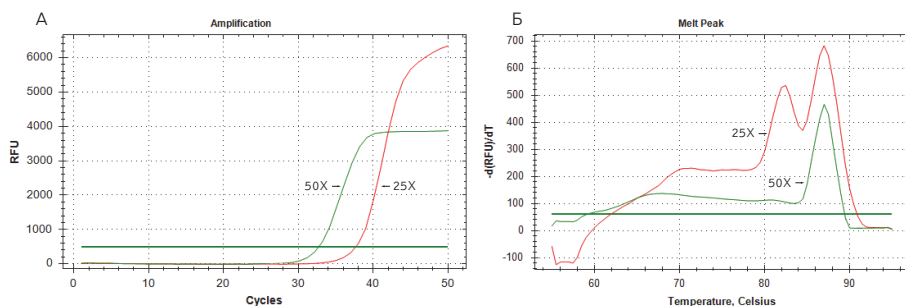


Рис. 2. Пример ингибирования ПЦР при двукратном увеличении концентрации SYBR Green I. Красный цвет – SYBR Green I использован как 25X, зеленый – как 50X.

В данной реакции SYBR Green I (25X) приводит к ингибированию: реакция развивается позже. Кроме того, он вызывает неспецифическую амплификацию (см. дополнительный пик на кривой плавления).

А: кривые амплификации; Б: кривые плавления.

5. Добавление в реакцию смесь DMSO до 5%.

Рекомендуется проверить несколько вариантов с разной концентрацией.

ВНИМАНИЕ: Следует учитывать, что готовые реакционные смеси для ПЦР могут содержать DMSO в своем составе.

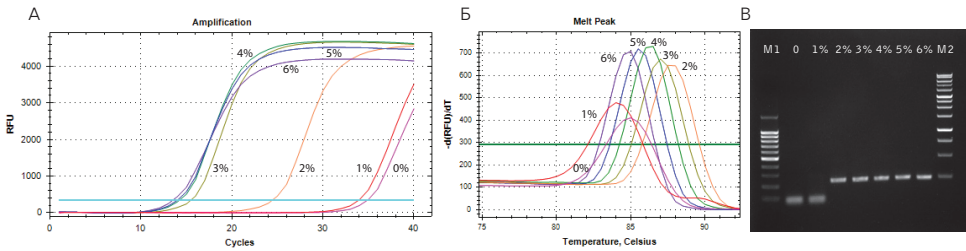


Рис. 3. Амплификация фрагмента ДНК с различным содержанием DMSO в реакции.

А – кривые амплификации,

Б – кривые плавления,

В – электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле

(M - Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (NL002, Евrogen).

Розовая линия – без DMSO, красная – 1% DMSO, желтая – 2%, светло-зеленая – 3%, зеленая – 4%, синяя – 5%, фиолетовая – 6% DMSO.

При увеличении в реакционной смеси концентрации DMSO начиная с 2% DMSO образуется специфический продукт. 4% DMSO - оптимальная концентрация для данной системы. При дальнейшем увеличении концентрации DMSO существенного смещения C_t не наблюдается (рис.2А).

Концентрация DMSO влияет на параметры кривых плавления. При увеличении содержания DMSO в реакции пики кривых плавления одного и того же ПЦР-продукта смещаются в область более низкой температуры (см. рисунок 3Б).