

Набор реактивов InBlood PCR kit и InBlood полимеразы

Состав наборов

Продукт	Кат.	Состав	Кол-во
Набор InBlood PCR kit	PK031	50x InBlood полимеразы (20 ед./мкл) - 100 мкл; 5x InBlood ПЦР буфер* - 1,2 мл; 50x dNTP (10mM каждого) - 120 мкл; MgCl ₂ , 50 mM - 300 мкл; вода для ПЦР - 4,5 мл.	на 100 р-ций (50 мкл каждая)
InBlood полимеразы	PK032	50x InBlood полимеразы (20 ед./мкл) - 100 мкл; 5x InBlood ПЦР буфер* - 1,2 мл.	на 100 р-ций (50 мкл каждая)
InBlood полимеразы**	PKT32	50x InBlood полимеразы (20 ед./мкл) - 20 мкл; 5x InBlood ПЦР буфер* - 0,1 мл.	на 20 р-ций (50 мкл каждая)

* 5x InBlood PCR буфер содержит 17,5 mM MgCl₂.

** Тестовый образец, не предназначен для продажи.

Хранение и транспортировка: -20°C

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки - 1 год.

Набор реактивов InBlood PCR kit предназначен для проведения генетических исследований на цельной крови методом ПЦР.

InBlood полимеразы представляет собой смесь термостабильных ДНК полимераз, обеспечивающих эффективную амплификацию фрагментов ДНК с использованием цельной крови в качестве матрицы (без предварительного выделения ДНК). InBlood полимеразы позволяет получать единичные ампликоны длиной до 1,5 т.п.о., а также проводить мультиплекс ПЦР при 1-20% (v/v) концентрации крови в реакционной смеси. Использование "горячего старта" обеспечивает InBlood полимеразе высокую чувствительность при низком уровне неспецифической амплификации.

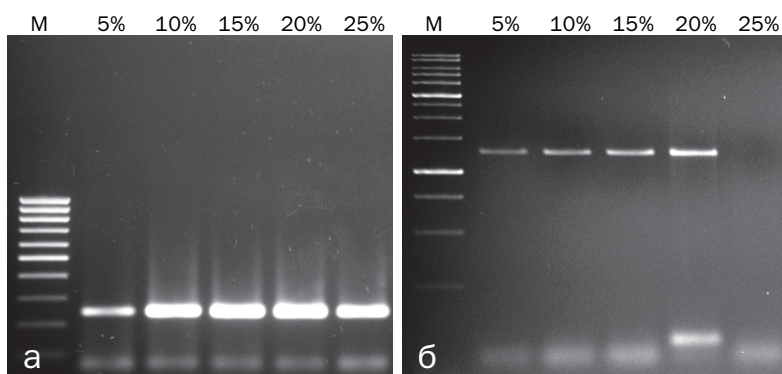
InBlood полимеразы может быть использована для ПЦР амплификации фрагментов ДНК из крови человека, млекопитающих (мышь, кошка, собака, крупный рогатый скот), а также некоторых видов птиц (куры, голуби).

Свойства InBlood полимеразы

- 5'>3' полимеразная активность
- Небольшая 3'>5' экзонуклеазная активность (proofreading)
- Отсутствие 5'>3' экзонуклеазной активности
- Высокая специфичность и точность амплификации
- Быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95°C)
- Устойчивость к содержащимся в крови ингибиторам ПЦР
- Возможность клонирования свежего продукта ПЦР в TA-векторы (например, в pAL-TA вектор, Евроген кат.# TA001)

Ограничения применения

- Не рекомендуется использовать inBlood полимеразу для амплификации из цельной крови фрагментов ДНК длиной свыше 1 500 п.о.
- InBlood полимеразы не может быть использована для ПЦР амплификации ДНК из образцов крови, в которые в качестве антикоагулянта добавлен гепарин или АСД.
- Не рекомендуется использовать inBlood полимеразу для прямой диагностики патогенов в крови. inBlood полимеразы может быть использована для анализа патогенов в выделенной ДНК.
- Не рекомендуется использовать inBlood полимеразу для SNP детекции.



Результат ПЦР амплификации фрагментов геномной ДНК человека с использованием крови в качестве матрицы. Процентное содержание крови (v/v) указано над дорожками. (а) Фрагмент ДНК гена SOX21, 373 п.о., 35 циклов ПЦР; (б) Фрагмент ДНК гена MHC, 1260 п.о., 42 цикла ПЦР.

Протокол ПЦР-амплификации с использованием крови в качестве матрицы

1. Информация о компонентах реакции

Кровь в качестве матрицы

Для амплификации ДНК может быть использована кровь, в которую в качестве антикоагулянта добавлены Na-цитрат (например, Vacuette 454330) или ЭДТА (например, Vacuette 454087); свежая или свежемороженая кровь без антикоагулянта; кровь, хранящаяся на фильтрах (например, Watman 903, FTA Elute cards, "Guthrie cards").

- Кровь для анализа собирают согласно стандартным протоколам забора крови в пробирки с антикоагулянтом. После забора кровь с антикоагулянтом можно хранить до 15 суток при +4°C
- Для ПЦР может быть также использована свежая или свежемороженая кровь без антикоагулянта (до момента образования тромба). После разморозки образец крови должен быть тщательно перемешан.
- Оптимальная концентрация крови человека в реакционной смеси - 5-10%. Оптимальные концентрации крови животных должны быть подобраны для каждого конкретного вида. Максимально допустимая концентрация цельной крови человека в реакционной смеси – 20-25%. При концентрации крови более 15% в пробирке формируется рыхлый осадок, затрудняющий отбор аликвот для нанесения на гель. При увеличении содержания крови в реакционной смеси лучших результатов удается достичь, если в кровь в качестве антикоагулянта добавлен ЭДТА (конечная концентрация ЭДТА не должна превышать 1 мМ).
- При использовании образцов крови, хранящихся на фильтрах, вместо добавления аликвоты крови в пробирку с реакционной смесью помещают бумажный диск или полоску с образцом крови (1мм).

Концентрация Mg²⁺

- 5x InBlood PCR buffer обеспечивает 3,5 мМ концентрацию ионов магния в реакционной смеси, что является оптимальным для большинства реакций.
- Если концентрация крови, в которую в качестве антикоагулянта добавлен цитрат натрия, более 10%, рекомендуется повысить концентрацию магния в реакционной смеси на 1-2 мМ (до конечной концентрации 4,5 – 5,5 мМ).*
- Для увеличения эффективности ПЦР при высокой концентрации крови в реакционной смеси (20-25%) рекомендуется повысить концентрацию MgCl₂ на 1-2 мМ (до конечной концентрации 4,5 – 5,5 мМ).*

* Для увеличения концентрации Mg²⁺ на 1 мМ к каждому 25 мкл реакционной смеси следует добавить 0,5 мкл 50 мМ MgCl₂.

Дизайн и концентрация праймеров

- Для дизайна праймеров можно воспользоваться программами Primer Select™ (DNA Star Inc, Madison) и Primer. Оптимальными для использования являются праймеры длиной 20-30 н.о., имеющие содержание GC пар - 40-60%. Конечная концентрация каждого праймера в реакции может варьировать в пределах 0,05-1 мкМ. Для рутинных генетических анализов крови рекомендуется использовать праймеры в конечной концентрации - 0,2-0,3 мкМ.

Объем реакционной смеси для ПЦР

- Не рекомендуется использовать реакционную смесь для ПЦР объемом менее 25 мкл. Если вы планируете добавлять в реакционную смесь кровь до концентрации более 15% (v/v), рекомендуется проводить реакцию в объеме не менее 50 мкл.

2. Протокол ПЦР с использованием крови в качестве матрицы

1. Разморозьте компоненты реакции и тщательно перемешайте.
2. Смешайте компоненты реакции как указано в Таблице 1.
Внимание! Кровь следует добавить в последнюю очередь. Перед добавлением крови перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирок на микроцентрифуге. Отберите аликвоту крови из пробы. Погрузите наконечник пипетки в реакционную смесь и одним движением дозатора добавьте аликвоту крови в пробирку. Дайте крови осесть на дно пробирки, не взбалтывая и не пипетируя. В случае, если вы используете ФТА-фильтры, инкубируйте диск (1 мм) в 50 мкл воды при 50°C 5 мин, после чего удалите воду и поместите диск в реакционную смесь.
3. Если ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю минерального масла.
4. Аккуратно, не встряхивая, перенесите пробирки в амплификатор. Используйте Таблицу 2 для задания программы ПЦР.
5. По окончании ПЦР проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза на агарозе. При объеме реакции 25 мкл для облегчения отбора проб для электрофореза рекомендуется провести центрифугирование пробирок или плашек с ПЦР-продуктом в течение 5 мин при максимальной скорости микроцентрифуги. При этом происходит формирование компактного дебрисного осадка на дне пробирок, не мешающего отбору проб для анализа.

Таблица 1. Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Реагент	Объем 25 мкл	Объем 50 мкл	Конечная концентрация реагента
Стерильная вода	До 25 мкл	До 50 мкл	-
5x буфер InBlood	5 мкл	10 мкл	1x
10 mM dNTP (каждого)	0,5 мкл	1мкл	0,2 мкМ
праймер 1 (10 мкМ)	0,75 мкл	1,5 мкл	0,3 мкМ
праймер 2 (10 мкМ)	0,75 мкл	1,5 мкл	0,3 мкМ
50x InBlood полимеразы	0,5 мкл	1 мкл	1x
Цельная кровь	2-3 мкл	4-8 мкл	2-20%

Для оптимизации амплификации GC-богатых участков можно добавить в реакционную смесь бетаин до концентрации 1 М и DMSO до концентрации 4% в 1x буфере для ПЦР.

Таблица 2. Параметры ПЦР

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время
предварительная денатурация*	1 цикл	95°C	2-3 мин
денатурация	30-45 циклов***	94-95°C	20 - 30 сек
отжиг		Tm** (55-68°C)	15 - 30 сек
элонгация		68-72°C	1-2 мин (из расчета 2 мин на 1 т.п.о.)
финальная элонгация	1 цикл	68-72°C	1 мин

* Предварительная денатурация образцов 95°C в течение 2-3 минут необходима для лизиса клеток и высвобождения ДНК

** Tm - температура отжига праймеров, рассчитывается по формуле $4(G+C)+2(A+T)$ °C. Оптимальные условия амплификации подбираются конечным пользователем.

*** Для амплификации целевого фрагмента с очищенной геномной ДНК в контрольной реакции требуется на 5-7 циклов меньше, чем для амплификации этого же фрагмента из крови.

ЗАО Евроген
 Москва 117997
 ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус 70
 (Технопарк ИБХ)
 Тел.: +7(495)988-4083
 Факс: +7(495)988-4085
www.evrogen.ru