



Mint RACE primer set

Набор праймеров для специфической амплификации
концевых фрагментов кДНК

Номер по каталогу SK004

Инструкция по применению

Набор реактивов Mint RACE primer set предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Содержание

I.	Назначение	1
II.	Состав и условия хранения	2
III.	Необходимые дополнительные материалы	2
IV.	Обзор основных процедур и методов	3
V.	Дизайн геноспецифических праймеров	8
	V.1. Основные требования к структуре праймеров	8
	V.2. Расположение праймеров на последовательности кДНК	8
	V.3. Проверка работы праймеров и оптимизация температуры отжига	10
	V.4. Концентрация праймеров в реакции	10
VI.	Протокол быстрой амплификации концов кДНК	10
	VI.1. Важные замечания и рекомендации	10
	VI.2. Подготовка матрицы кДНК	11
	VI.3. I раунд амплификации	13
	VI.4. II раунд амплификации	15
	VI.5. III раунд амплификации	17
VII.	Клонирование и секвенирование	19
VIII.	Амплификация полноразмерной последовательности целевого транскрипта	21
IX.	Возможные трудности и их решение	22
	Приложение I.	28
	Реамплификация фрагмента ДНК перед клонированием	28
	Приложение II.	30
	Выявление 5'-концевых последовательностей транскриптов длиной более 5-6 т.о.	30
	Ссылки	31

I. Назначение

В состав набора входят смеси олигонуклеотидных адаптерных праймеров, позволяющие выполнить быструю амплификацию 5'- и 3'-концевых фрагментов целевых транскриптов (Rapid Amplification of cDNA Ends – RACE) с кДНК-матрицы, приготовленной с помощью набора для синтеза кДНК Mint (#SK001) и обогащенной полноразмерными последовательностями.

Для выявления 5'- и 3'-концевых последовательностей используется технология Step-Out RACE (Matz *et al.*, 1999). В настоящий момент этот метод является самым быстрым и надежным способом получить данные о структуре полноразмерного транскрипта, основываясь на минимальной информации о его последовательности (30-50 нуклеотидов). Технология Step-Out RACE не включает технологически сложного процесса лигирования адаптеров и заменяет трудоемкую процедуру клонирования и скрининга полноразмерной библиотеки кДНК.

В набор входят геноспецифические праймеры, позволяющие выполнить контрольную амплификацию 5'- и 3'-концевых фрагментов кДНК гена G3PDH мыши на контрольной матрице.

Преимущества метода

- Протокол не включает технологически сложных процедур (не требуется лигирования адаптеров, клонирования и скрининга полноразмерной библиотеки)
- Срок выполнения – 1-2 дня

II. Состав и условия хранения

Набор рассчитан на 200 реакций в объеме 25 мкл.

#	Компонент	Количество
1	25x Смесь праймеров Step-out primer mix1: - Праймер Long1, 0.25 мкМ (5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') - Праймер Short1, 2.5 мкМ (5' -GTAATACGACTCACTATAGGGC-3')	200 мкл
2	25x Смесь праймеров Step-out primer mix2: - Праймер Long2, 0.25 мкМ (5' -TGTAGCGTGAAGACGACAGAAGTAATACGACTCACTATAGGGC-3') - Праймер Short2, 2.5 мкМ (5' -TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3')	200 мкл
3	25x Смесь праймеров Step-out primer mix3: - Праймер Long3, 0.25 мкМ (5' -AGCAGCGAACTCAGTACAACATGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3') - Праймер Short3, 2.5 мкМ (5' -AGCAGCGAACTCAGTACAACA-3')	200 мкл
4	Контрольный 3'-праймер (Control 3'-forward primer), 10 мкМ (5' -GCATCCTGCACCACCAACTG-3')	25 мкл
5	Контрольный 5'-праймер (Control 5'-reverse primer), 10 мкМ (5' -GAGCTTCCCGTTCAGCTCTG-3')	25 мкл
6	Стерильная вода (Sterile PCR water)	4.5 мл (3 X 1.5мл)

Пробирки подписаны по-английски, английские названия даны в скобках.

Хранение и транспортировка: -20°C

III. Необходимые дополнительные материалы

1) Реагенты для синтеза, амплификации и очистки кДНК

- Набор для синтеза кДНК Mint (Евроген, #SK001)
- Набор для амплификации Encyclo (Евроген, #PK001)
- Геноспецифические праймеры (см. рекомендации по дизайну праймеров на стр. 8)

- Набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген, #BC022)

2) Реагенты для гель-электрофореза

- 1.2% агароза на 1xTAE буфере с бромистым этидием (0.3 мг/л)
- 1xTAE-буфер с бромистым этидием (0.3 мг/л)
- Маркеры длин ДНК (1kb DNA ladder и 100 bp DNA ladder)

3) Реагенты для клонирования продуктов ПЦР

- Вектор для клонирования (например, pAL-TA вектор, Евроген, #TA001)
- T4 ДНК лигаза с буфером
- Компетентные клетки (например, компетентные клетки для химической трансформации, Евроген, #CC001)
- Селективная среда и LB-агар с ампициллином для культивирования клеток *E.coli*.

IV. Обзор основных процедур и методов

Первым этапом при идентификации целевых транскриптов является получение кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями, с помощью набора для синтеза кДНК Mint (#SK001). В качестве стартового материала для синтеза кДНК может быть использована как поли(A)+, так и тотальная РНК. Технология Mint позволяет получать кДНК (первая цепь кДНК и амплифицированная кДНК), все молекулы которой фланкированы универсальными последовательностями адаптера M1 (рис. 1).

На втором этапе в ходе одной или нескольких последовательных ПЦР из образца кДНК амплифицируют гомогенные фрагменты кДНК, фланкирующие известную последовательность (рис. 2).

При амплификации применяется техника пошагового «внешнего праймирования» универсальными смесями адаптерных праймеров (step-out ПЦР) одновременно с пошаговым «заглублением» геноспецифических праймеров (nested ПЦР).

IV Обзор основных процедур и методов

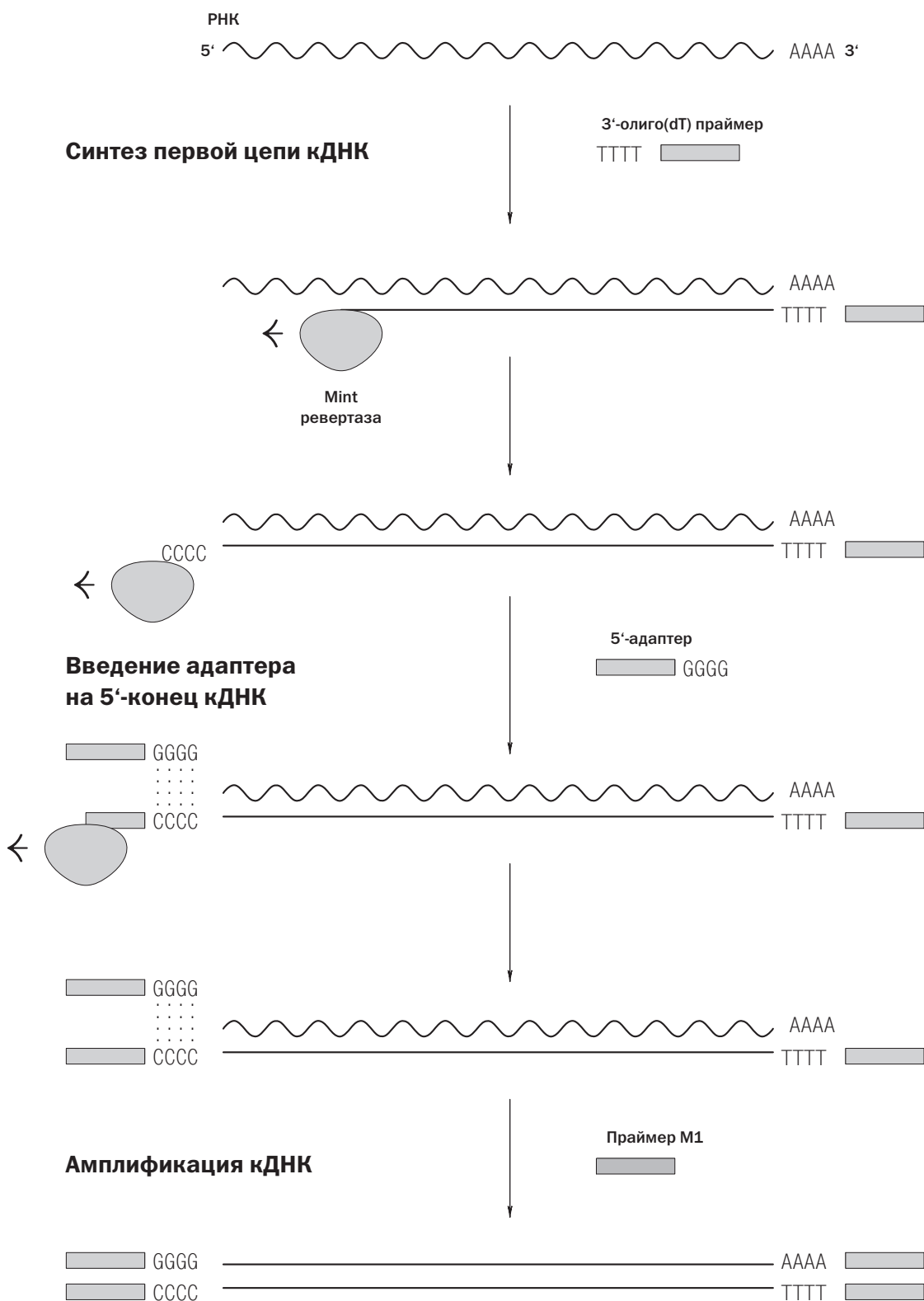


Рис. 1. Схема синтеза и амплификации кДНК с помощью набора реактивов Mint (#SK001, Евроген).

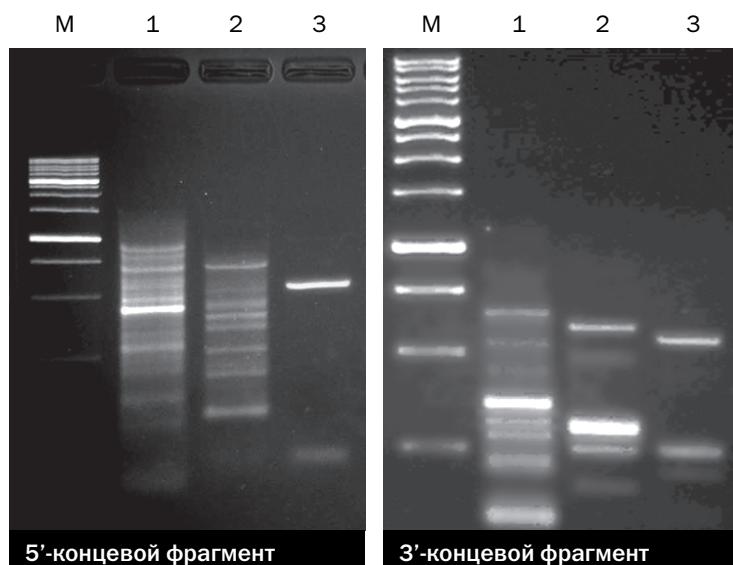


Рис. 2. Результат амплификации 5'- и 3'-концевых фрагментов кДНК флуоресцентного белка из кораллового полипа *Zoanthus*. Дорожки 1, 2, 3 – Последовательное нанесение продуктов I, II и III раундов ПЦР.

Концентрация праймеров в смесях Step-out primer mix, позволяющих осуществлять step-out ПЦР, подобрана таким образом, что длинный праймер участвует только в первых циклах ПЦР, создавая на концах молекул кДНК последовательность, соответствующую его внешней части. В результате формируется сайт для отжига короткого адаптера. На первых циклах длинный праймер полностью расходуется и перестает участвовать в реакции; дальнейшая амплификация происходит с короткого адаптера (рис. 3, 4).

Количество циклов ПЦР, необходимое для получения гомогенных 3'- или 5'-фрагментов кДНК, определяется в процессе работы и зависит от природы, длины исследуемого транскрипта и его представленности, сложности образца кДНК, эффективности работы геноспецифических праймеров.

Рекомендации по дизайну геноспецифических праймеров для nested ПЦР приведены в разделе V. «Дизайн геноспецифических праймеров» на стр. 8.

Продукты ПЦР далее клонируют в плазмидный вектор (например, в рAL-TA вектор, #TA001) для дальнейшего секвенирования. Целевые клоны могут содержать нуклеотидные замены, возникшие в ходе реакции обратной транскрипции и ПЦР. Для выявления и исключения точечных замен, в каждом случае рекомендуется секвенировать 3–5 независимых клонов.

IV Обзор основных процедур и методов

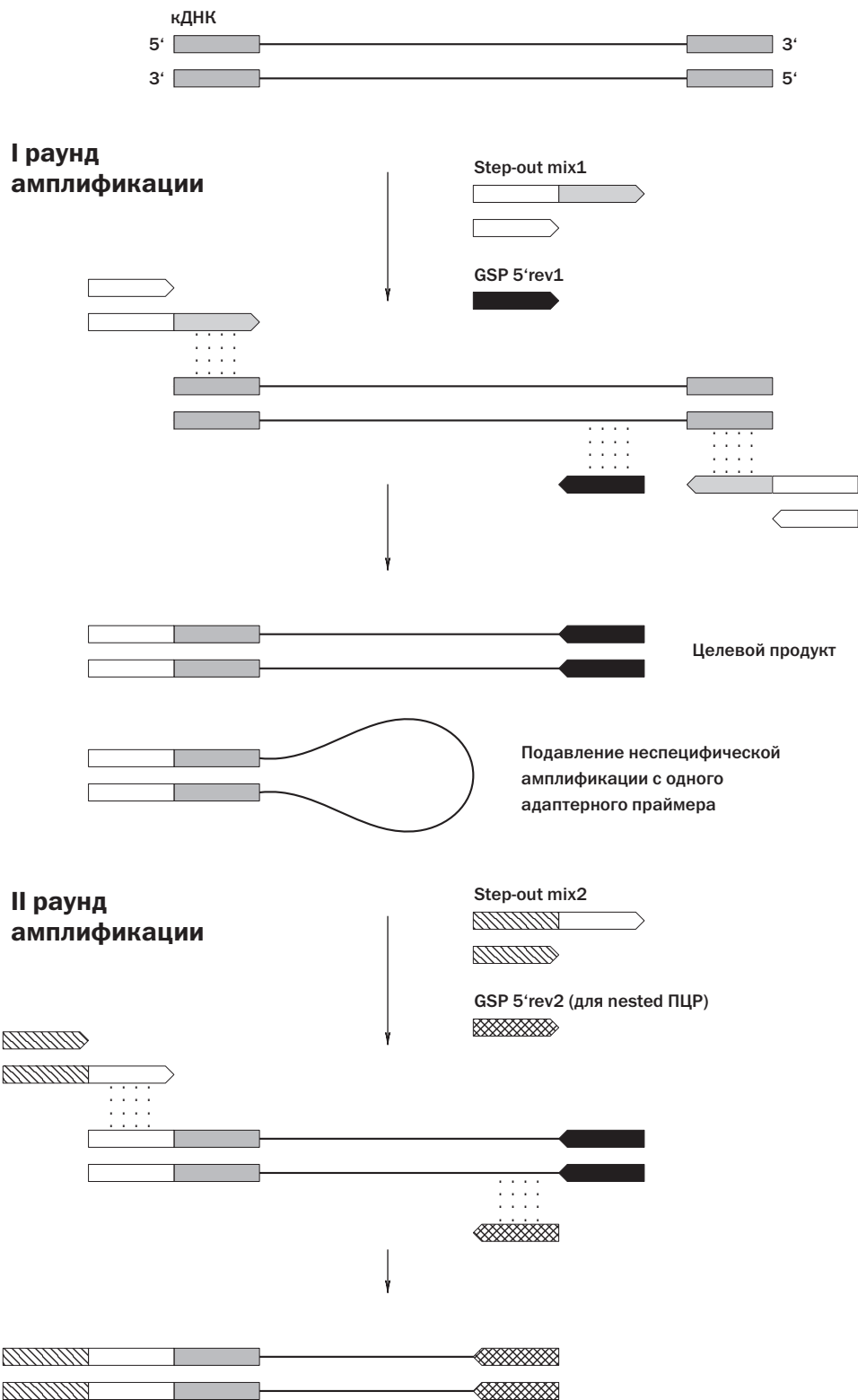


Рис. 3. Схема I и II раундов быстрой амплификации 5'-концевого фрагмента кДНК. GSP - геноспецифический праймер; прямоугольниками обозначены адаптеры, праймеры и комплементарные им последовательности.

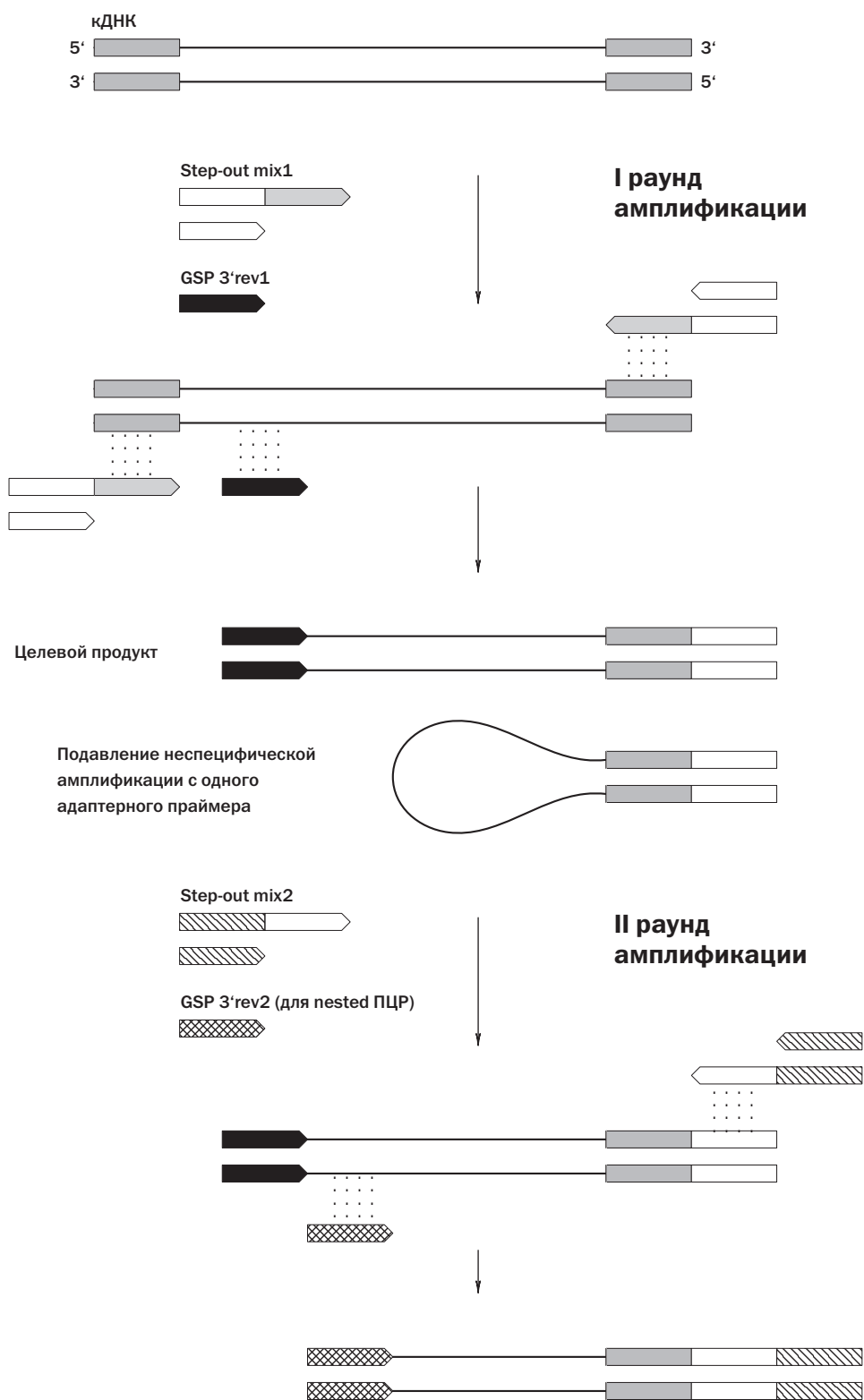


Рис. 4. Схема I и II раундов быстрой амплификации 3'-концевого фрагмента кДНК. GSP - геноспецифический праймер; прямоугольниками обозначены адаптеры, праймеры и комплементарные им последовательности.

V Дизайн геноспецифических праймеров

В ряде случаев известной последовательности кДНК соответствуют несколько транскриптов. Чтобы убедиться, что выявленные в результате 5'- и 3'-RACE фрагменты принадлежат одному транскрипту, осуществляют амплификацию полного фрагмента целевой последовательности, используя пару встречных геноспецифических праймеров.

V. Дизайн геноспецифических праймеров

Для дизайна геноспецифических праймеров необходимо располагать информацией о нуклеотидной последовательности фрагмента целевого транскрипта (по крайней мере, 30-50 н.п.). Если имеются данные только об аминокислотной последовательности, можно использовать вырожденные праймеры.

Для дизайна и анализа праймеров рекомендуется использовать общедоступные программы, такие как Vector NTI (Invitrogen), Primer Express (Applied Biosystems) и др.

V.1. Основные требования к структуре праймеров

- Длина праймеров должна быть 19-30 п.о.
- Температура отжига выше 55°C.
- Содержание GC – не более 60-65%.
- Чтобы минимизировать неспецифическую амплификацию, праймеры не должны содержать последовательностей, которые могут образовать самокомплементарные структуры, такие как шпильки или дуплексы. Необходимо удостовериться, что геноспецифические праймеры не формируют вторичных структур с парными адаптерными праймерами, входящими в набор.

V.2. Расположение праймеров на последовательности кДНК

Так как амплификация длинных фрагментов ДНК происходит с существенно меньшей эффективностью, чем коротких, геноспецифические праймеры для RACE следует располагать как можно ближе к концу известной последовательности, так, чтобы амплифицируемые фрагменты не превышали 1.5-2 т.п.о.

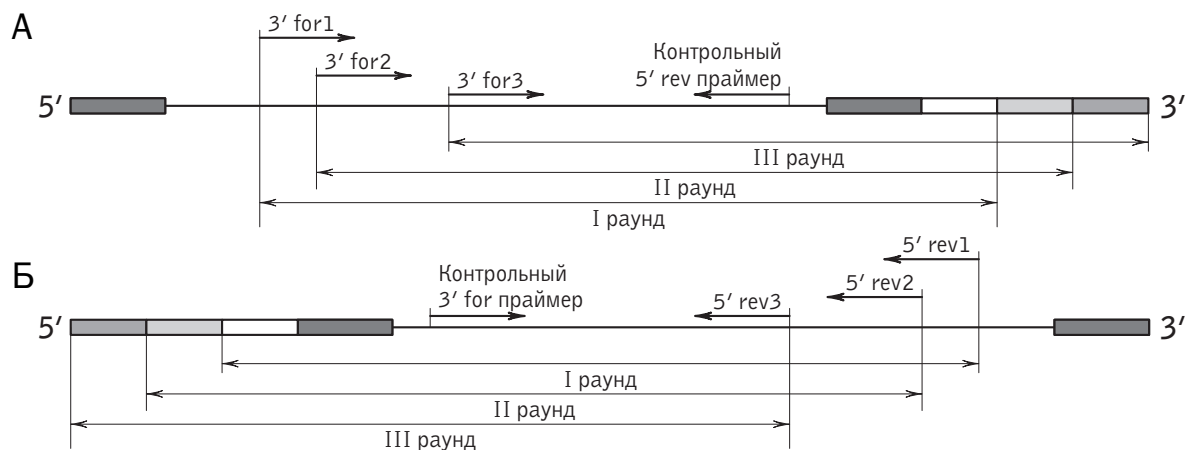


Рис. 5. Схема расположения праймеров для постановки амплификации 3'-концевого (А) и 5'-концевого (Б) фрагментов кДНК.

Для достижения наилучшего результата праймеры для nested ПЦР должны быть сдвинуты относительно друг друга как минимум на 9-12 н.о. (рис. 5), а в идеальном случае вовсе не перекрываться.

Для унификации номенклатуры геноспецифических праймеров в протоколе использованы следующие обозначения:

- «3' for» – праймеры, направленные в сторону 3'-конца транскрипта и предназначенные для амплификации 3'-концевой области целевой кДНК.
- «5' rev» – праймеры, направленные в сторону 5'-конца транскрипта и предназначенные для амплификации 5'-концевой области целевой кДНК.
- Праймеры для разных раундов амплификации пронумерованы в порядке их использования.

Например, геноспецифические праймеры для амплификации 3'-концевой области обозначены 3'for1 (первый раунд амплификации), 3'for2 (второй раунд амплификации), 3'for3 (третий раунд амплификации), а для амплификации 5'-концевой области – 5'rev1, 5'rev2, 5'rev3, соответственно.

V.3. Проверка работы праймеров и оптимизация температуры отжига

Эффективную работу каждого из геноспецифических праймеров рекомендуется проверить до начала процедуры RACE. Для этого следует осуществить ПЦР-амплификацию известного фрагмента ДНК с использованием тестируемого геноспецифического и контрольного встречного праймеров. Если потребуется, нужно подобрать оптимальную температуру отжига для каждого праймера.

Этот эксперимент позволяет также приблизительно оценить представленность целевого транскрипта в образце тотальной кДНК и определить количество циклов, необходимое для постановки первого раунда амплификации (не менее, чем для амплификации фрагмента с двумя специфическими праймерами).

V.4. Концентрация праймеров в реакции

Рекомендуемая концентрация специфического праймера в 1х реакционной смеси – 0.2-0.4 мкМ. Концентрацию вырожденного праймера необходимо увеличить в 2-3 раза (до конечной концентрации 0.4-1.2 мкМ).

VI. Протокол быстрой амплификации концов кДНК

- ▶ ***Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!***

VI.1. Важные замечания и рекомендации

1. Протокол оптимизирован для использования набора реактивов Mint (#SK001) и полимеразы Encyclo (#PK001; PK002).
2. В качестве матрицы для ПЦР может быть использована как амплифицированная кДНК, так и первая цепь кДНК. В некоторых случаях (в зависимости от природы и представленности целевого транскрипта) лучший результат может быть достигнут при использовании амплифицированной кДНК в качестве ПЦР-матрицы, а в других случаях – при использовании первой цепи. Выбор наилучшей матрицы для первого раунда ПЦР может быть сделан только опытным путем. Использование первой цепи кДНК позволяет уменьшить суммарное

число циклов ПЦР, необходимое для амплификации целевого транскрипта, и, соответственно, уменьшить число замен, возникающих в последовательности ДНК в ходе ПЦР. Однако, первая цепь кДНК значительно менее стабильна при хранении, чем амплифицированная кДНК. Поэтому, если процедуры синтеза кДНК и RACE разнесены по времени (более 3 месяцев), рекомендуется использовать амплифицированную кДНК.

3. Протокол может включать от одного до трех последовательных раундов амплификации, в каждом из которых происходит обогащение продукта ПЦР искомой последовательностью ДНК. После получения гомогенного по длине ПЦР-продукта (после 2 или 3 раунда амплификации), его необходимо клонировать для дальнейшего секвенирования.

4. Чтобы исключить фоновую амплификацию с одного праймера, в каждом раунде амплификации рекомендуется поставить контрольную реакцию с добавлением матрицы и одного геноспецифического праймера. Это позволит отличить искомый продукт амплификации от возможных нецелевых продуктов.

5. Для каждого раунда амплификации очень важно правильно подобрать оптимальные условия ПЦР. Это позволит увеличить выход специфического продукта и уменьшить фоновую амплификацию. Параметры реакции сильно зависят от многих факторов, например, от типа амплификатора, свойств ДНК полимеразы, качества кДНК-матрицы, представленности и длины исследуемого транскрипта, структуры геноспецифических праймеров.

VI.2. Подготовка матрицы кДНК

1. Приготовьте первую цепь и амплифицированную кДНК, следуя инструкции к набору для синтеза кДНК Mint (#SK001). Используйте контрольную РНК (Control total RNA), входящую в набор Mint для получения контрольной кДНК.

- ▶ *Качество РНК экспериментального образца во многом определяет успешность амплификации концевых фрагментов целевого транскрипта. Если для амплификации образца кДНК (с концентрацией примерно 20 нг/мкл) согласно протоколу Mint с экспериментального образца РНК*

VI Протокол быстрой амплификации концов кДНК

потребовалось 23 и более циклов ПЦР, и средний размер кДНК не превысил 1-2 т.п.о, это может свидетельствовать о деградации исходной РНК. Такие образцы кДНК могут не содержать (или содержать крайне мало) 5'-концевых фрагментов кДНК. В этом случае выполнение протокола может не привести к успеху.

2. Проверьте качество синтеза кДНК и эффективность работы реагентов в контрольном эксперименте. Для этого выполните процедуры, описанные в разделе VI.3. «I раунд амплификации» на стр. 13, используя в качестве матрицы контрольную кДНК и контрольные геноспецифические праймеры, позволяющие амплифицировать 3'- и 5'-концевые фрагменты гена G3PDH мыши. Типичный результат амплификации и схема расположения геноспецифических праймеров на последовательности G3PDH мыши показаны на рис. 6.

- ▶ В контрольном эксперименте гомогенные фрагменты кДНК должны быть получены в I раунде амплификации и выполнение последующих процедур протокола не требуется.

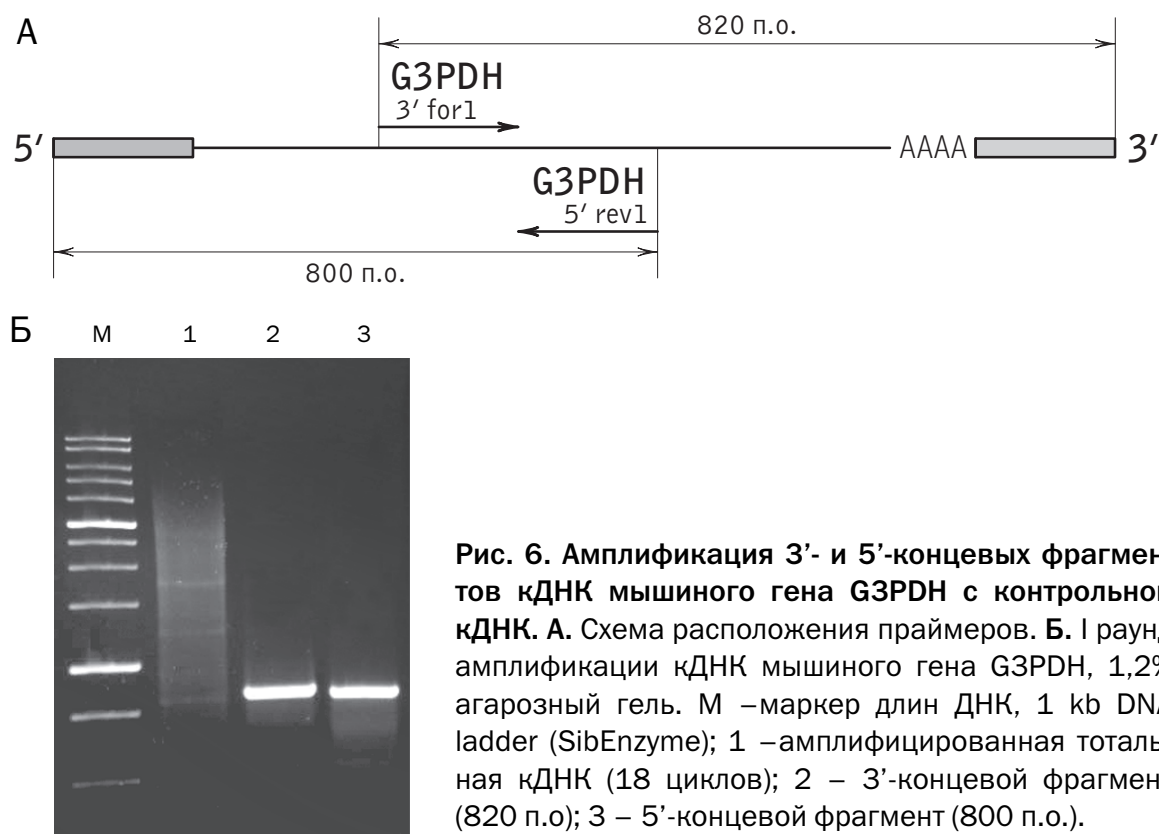


Рис. 6. Амплификация 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК мышинового гена G3PDH с контрольной кДНК. А. Схема расположения праймеров. Б. I раунд амплификации кДНК мышинового гена G3PDH, 1,2% агарозный гель. М – маркер длин ДНК, 1 kb DNA ladder (SibEnzyme); 1 – амплифицированная тотальная кДНК (18 циклов); 2 – 3'-концевой фрагмент (820 п.о.); 3 – 5'-концевой фрагмент (800 п.о.).

VI.3. I раунд амплификации

- 1) Отберите 2 мкл кДНК-матрицы (первая цепь кДНК или амплифицированная кДНК) в чистую стерильную пробирку.
 - ▶ *Перед взятием аликвоты образец кДНК, хранившийся при -20°C , необходимо прогреть 2 мин при 70°C для дезагрегации ДНК и затем перемешать содержимое.*
- 2) Если в качестве матрицы используется первая цепь кДНК, добавьте к ней 8 мкл стерильной воды.
Если в качестве матрицы для первого раунда используется амплифицированная кДНК, добавьте к ней 38 мкл стерильной воды.
- 3) Приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке:
 - 40 мкл Стерильная вода
 - 5 мкл 10X буфер для Encyclo
 - 1 мкл Смесь dNTP (10 mM каждого)
 - 1 мкл Специфический праймер 1 (10 мкМ)
 - 2 мкл кДНК со стадии «I раунд амплификации пункт 2»
 - 1 мкл 50X Encyclo полимеразы

 - 50 мкл Суммарный объем
- 4) Аккуратно перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
- 5) Разделите смесь на две аликвоты (примерно по 25 мкл) в чистые пробирки для ПЦР. Одну из пробирок пометьте как «контрольную», вторую – как «экспериментальную».
 - ▶ *Для амплификации в I раунде используют геноспецифический праймер 1 и смесь внешних адаптеров Step-out primer mix 1. Параллельно осуществляют постановку контрольной реакции с одним геноспецифическим праймером.*
- 6) В «экспериментальную» пробирку добавьте 1 мкл 25x Step-out primer mix1.
- 7) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки.

Поместите пробирки в амплификатор.

- 8) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	22 цикла	$T_m \leq 68^\circ\text{C}$	20 сек
		72°C	3 мин

Температура отжига Step-out primer mix 1 = 68°C. Для приблизительного расчета температуры отжига геноспецифического праймера можно воспользоваться формулой: $T_m (\text{°C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$. В программе ПЦР следует использовать наименьшую из этих двух T_m .

- 9) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. Оставшийся продукт ПЦР оставьте на столе.
- 10) Если по данным электрофореза реакция в «экспериментальной» пробирке еще «не вышла на насыщение», верните пробирки в амплификатор и добавьте 2-4 цикла ПЦР. При полном отсутствии продуктов реакции добавьте 6 циклов ПЦР.
- В ряде случаев, особенно при использовании вырожденных праймеров, в первом раунде требуется до 30–35 циклов амплификации.
- 11) Анализ результатов:

- Если после амплификации в первом раунде в «экспериментальной» пробирке получился однородный продукт, который на электрофореграмме выглядит как индивидуальная полоса, а в «контрольной» пробирке такой продукт отсутствует, переходите к разделу VII. «Клонирование и секвенирование» на стр. 19.
- Если в «экспериментальной» и «контрольной» пробирках присутствуют однородные продукты одинаковой длины и интенсивности, это свидетельствует о неспецифической амплификации только с одного праймера. В этом случае необходимо заменить геноспецифический праймер.

- В случае появления неоднородного продукта (набор полос различной длины) в «экспериментальной» пробирке нужно перейти ко второму раунду амплификации.

Продукт ПЦР может храниться до 6 месяцев при -20°C .

VI.4. II раунд амплификации

- 1) Отберите 2 мкл полученного в I раунде амплификации ПЦР-продукта в чистую стерильную пробирку.
 - ▶ *Перед взятием аликвоты прогрейте образец ДНК, хранившийся при -20°C , в течение 2 мин при 70°C для дезагрегации ДНК и затем перемешать содержимое.*
- 2) Добавьте к аликвоте ПЦР-продукта 38 мкл стерильной воды.
- 3) Приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X буфер для Encyclo
1 мкл	Смесь dNTP (10 мМ каждого)
1 мкл	Специфический праймер 2 (10 мкМ)
2 мкл	кДНК со стадии «II раунд амплификации пункт 2»
1 мкл	50X Encyclo полимеразы

50 мкл Суммарный объем
- 4) Аккуратно перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
- 5) Разделите смесь на две аликвоты (примерно по 25 мкл) в чистые пробирки для ПЦР. Одну из пробирок пометьте как «контрольную», вторую – как «экспериментальную».
 - ▶ *Для амплификации в II раунде используют геноспецифический праймер 2 и смесь внешних адаптеров Step-out primer mix 2. Параллельно осуществляют постановку контрольной реакции с одним геноспецифическим праймером.*

VI Протокол быстрой амплификации концов кДНК

- 6) В «экспериментальную» пробирку добавьте 1 мкл 25x Step-out primer mix2.
- 7) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки. Поместите пробирки в амплификатор.
- 8) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	14 циклов	$T_m \leq 66^\circ\text{C}$	20 сек
		72°C	3 мин

Температура отжига Step-out primer mix 2 = 66°C. Для приблизительного расчета температуры отжига геноспецифического праймера можно воспользоваться формулой: $T_m (\text{°C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$. В программе ПЦР следует использовать наименьшую из этих двух T_m .

- 9) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. Оставшийся продукт ПЦР оставьте на столе.
- 10) Если по данным электрофореза реакция в «экспериментальной» пробирке еще «не вышла на насыщение», верните пробирки в амплификатор и добавьте 2-4 цикла ПЦР. При полном отсутствии продуктов реакции добавьте 6 циклов ПЦР.
 - ▶ Обычно, для II раунда амплификации требуется на 6-10 циклов меньше, чем для первого.
- 11) Анализ результатов: после II раунда продукт ПЦР в агарозном геле может выглядеть как одна или несколько индивидуальных полос.
 - Если в «экспериментальной» пробирке получился однородный продукт, который на электрофореграмме выглядит как индивидуальная полоса, а в «контрольной» пробирке такой продукт отсутствует, переходите к разделу VII. «Клонирование и секвенирование» на стр. 19.

- Если в «экспериментальной» и «контрольной» пробирках присутствуют однородные продукты одинаковой длины и интенсивности, это свидетельствует о неспецифической амплификации только с одного праймера. В этом случае необходимо заменить геноспецифический праймер.
- В случае появления неоднородного продукта (набор полос различной длины) в «экспериментальной» пробирке переходите к третьему раунду амплификации.

Продукт ПЦР может храниться до 6 месяцев при -20°C .

VI.5. III раунд амплификации

- 1) Отберите 2 мкл полученного в II раунде амплификации ПЦР-продукта в чистую стерильную пробирку.
 - ▶ *Перед взятием аликвоты образец ДНК, хранившийся при -20°C , необходимо прогреть 2 мин при 70°C для дезагрегации ДНК и затем перемешать содержимое.*
 - 2) Добавьте к аликвоте ПЦР-продукта 38 мкл стерильной воды.
 - 3) Приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке:
 - 40 мкл Стерильная вода
 - 5 мкл 10X буфер для Encyclo
 - 1 мкл Смесь dNTP (10 мМ каждого)
 - 1 мкл Специфический праймер 3 (10 мкМ)
 - 2 мкл κДНК со стадии «III раунд амплификации пункт 2»
 - 1 мкл 50X Encyclo полимеразы

 - 50 мкл Суммарный объем
- 4) Аккуратно перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 - 5) Разделите смесь на две аликвоты (примерно по 25 мкл) в чистые пробирки для ПЦР. Одну из пробирок пометьте как «контрольную», вторую – как «экспериментальную».

VI Протокол быстрой амплификации концов кДНК

- Для амплификации в III раунде используют геноспецифический праймер 3 и смесь внешних адаптеров *Step-out primer mix 3*. Параллельно осуществляют постановку контрольной реакции с одним геноспецифическим праймером.
- 6) В «экспериментальную» пробирку добавьте 1 мкл 25x *Step-out primer mix 3*.
- 7) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки. Поместите пробирки в амплификатор.
- 8) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	14-16 циклов	$T_m \leq 66^\circ\text{C}$	20 сек
		72°C	3 мин

Температура отжига *Step-out primer mix 3* = 66°C. Для приблизительного расчета температуры отжига геноспецифического праймера можно воспользоваться формулой: $T_m (\text{°C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$. В программе ПЦР следует использовать наименьшую из этих двух T_m .

- 9) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. Оставшийся продукт ПЦР оставьте на столе.
- 10) Если по данным электрофореза реакция в «экспериментальной» пробирке еще «не вышла на насыщение», верните пробирки в амплификатор и добавьте 2 цикла ПЦР.
- В III раунде обычно требуется не более 16 циклов ПЦР. Если за 16-18 циклов специфическая полоса не появляется, то дальнейшая амплификация может привести к образованию неспецифического продукта.
- 11) Анализ результатов: После III раунда амплификации продукт ПЦР в агарозном геле может выглядеть как одна или несколько инди-

видуальных полос.

- Если в «экспериментальной» пробирке получился однородный продукт, который на электрофореграмме выглядит как индивидуальная полоса, а в «контрольной» пробирке такой продукт отсутствует, переходите к разделу VII. «Клонирование и секвенирование» на стр. 19.
- Если в «экспериментальной» и «контрольной» пробирках присутствуют однородные продукты одинаковой длины и интенсивности, это свидетельствует о неспецифической амплификации только с одного праймера. В этом случае необходимо заменить геноспецифический праймер.
- Если после последнего раунда по данным гель-электрофореза в образце присутствуют две или более полос, рекомендуется аккуратно разделить их на геле, вырезать и клонировать индивидуально. Иногда требуется количественная наработка ДНК после элюции из геля. Для этого реамплифицируйте элюат (см. Приложение I. «Реамплификация фрагмента ДНК перед клонированием» на стр. 28).

Продукт ПЦР может храниться до 6 месяцев при -20°C .

VII. Клонирование и секвенирование

- 1) Клонируйте и отсекуйте продукт ПЦР согласно стандартным протоколам. Например, свежий ПЦР-продукт можно клонировать в Т-вектор (pAL-TA вектор #TA001, Евроген).
- ▶ В ряде случаев, когда фрагмент ДНК выглядит на электрофореграмме как одна гомогенная полоса, его можно секвенировать без клонирования после очистки на колонке. Однако, в связи с тем, что транскрипты могут проявлять полиморфизм (альтернативный сплайсинг, аллельные формы, мультигенные семейства), для получения достоверной информации о последовательности продукт лучше клонировать, а затем отсекуйте несколько независимых клонов.
 - ▶ Последовательности фрагментов ДНК, полученных в результате

VII Клонирование и секвенирование

амплификации концов кДНК, соответствуют последовательностям мРНК и могут включать некодирующие 5'- и 3'-области.

- ▶ Следует помнить, что полученные фрагменты ДНК с одного конца содержат последовательность адаптера (60-80 п.н.), а с другого – последовательность геноспецифического праймера, использованного в последнем раунде амплификации.
- ▶ Для секвенирования можно использовать праймер T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC), последовательность которого содержится в последовательности адаптера, входящего в *Step-out primer mix1*. Однако, при наличии в векторе для клонирования T7 промотера, использование T7 праймера для секвенирования неприемлемо, следует выбирать иной праймер (геноспецифический или плазмидный праймер).
- ▶ Если вы планируете секвенирование клонированного фрагмента ДНК с плазмидного праймера, для уменьшения длины адаптерных последовательностей перед клонированием подвергните конечный продукт RACE ре-амплификации с геноспецифическим праймером и праймером M1 (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT), входящим в набор реактивов Mint (#SK001) (см. Приложение I. «Реамплификация фрагмента ДНК перед клонированием» на стр. 28). В этом случае структура продукта RACE утратит концевые адаптерные последовательности, в том числе последовательность T7-праймера.

VIII. Амплификация полноразмерной последовательности целевого транскрипта

- 1) Проведите анализ полученных последовательностей с помощью общедоступного программного обеспечения, например, пакетов программ:

BLAST 9 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

или EXPASY (<http://www.expasy.org/tools>).

- 2) Если анализ последовательностей показывает, что в ходе RACE не были получены полные 5'- и 3'-концевые фрагменты транскрипта, повторите процедуру RACE, используя новую информацию о последовательностях для дизайна нового набора геноспецифических праймеров.

Если структуры полученных фрагментов соответствуют концевым последовательностям целевого транскрипта, проведите амплификацию полноразмерной кДНК с пары встречных геноспецифических праймеров с использованием первой цепи кДНК в качестве матрицы.

- ▶ *Наличие в продукте ПЦР специфического продукта ожидаемой длины позволит подтвердить, что клонированные 5'- и 3'-концевые фрагменты принадлежат одному транскрипту, а не получены из разных молекул кДНК, содержащих высокомолекулярные сайты для отжига геноспецифических праймеров.*

IX. Возможные трудности и их решение

1. Продукт ПЦР отсутствует или имеет низкую концентрацию в контрольном эксперименте

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Ошибка в процессе работы или порча некоторых реактивов во время транспортировки или хранения.	Проверьте, не была ли допущена ошибка в процессе работы. Проверьте работоспособность реагентов, поставив контрольные реакции, рекомендованные для наборов Encyclo и Mint. Проконтролируйте качество реакции синтеза кДНК, используя контрольный образец РНК.
Использованы неоптимальные параметры ПЦР.	Оптимальные параметры ПЦР зависят от амплификатора, времени хранения ферментов, природы ДНК матрицы. Если ПЦР выходит на плато через 25 циклов и более, возможно, параметры ПЦР не оптимальны. Осуществите оптимизацию параметров ПЦР как описано в инструкции к набору реактивов Encyclo PCR kit (#PK001) и повторите амплификацию. Если Вам не удалось добиться результата в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евrogen: customer-support@evrogen.ru

2. Продукт ПЦР отсутствует при амплификации опытного образца

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Геноспецифический праймер не работает.	Убедитесь, что пункт 5.3. «Проверка работы праймеров и оптимизация температуры отжига» на стр. 10 был выполнен и условия для работы праймеров были оптимизированы. Если один из праймеров не работает в контрольной реакции, замените его, используя другую последовательность.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Недостаточная концентрация вырожденного праймера.	Если в амплификации используются вырожденные праймеры, увеличьте их концентрацию в 2-3 раза.
Целевой фрагмент имеет GC-богатый состав или сложную вторичную структуру, препятствующую прохождению ПЦР.	Добавление в ПЦР DMSO или бетаина увеличивает эффективность амплификации матриц со сложными структурами. Иногда проблема решается подбором специальной полимеразы, адаптированной для амплификации участков со сложной вторичной структурой.
Интересующий транскрипт может иметь очень низкий уровень представленности, либо вообще отсутствовать в ткани, из которой была выделена РНК.	Для успешной амплификации концов кДНК рекомендуется как можно точнее отделить нужную ткань, которая содержит изучаемый транскрипт. Проверьте, присутствует ли целевой транскрипт в образце с помощью ПЦР с двух встречных геноспецифических праймеров. Если продукт не образуется за 36-40 циклов, то в данном образце РНК искомым транскрипт имеет низкую концентрацию, не позволяющую выполнить данный протокол.
Для синтеза кДНК была использована РНК низкого качества.	Проверьте качество РНК с помощью гель-электрофореза. Учтите требования к качеству РНК, изложенные в протоколе Mint (#SK001). Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК.

3. 5'-концевой продукт не образуется при успешной амплификации 3'-концевой последовательности

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Для синтеза кДНК была использована РНК низкого качества.	При использовании частично деградировавшей РНК иногда удается осуществить амплификацию 3'-концевого фрагмента, но амплификации 5'-концевого фрагмента не происходит.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
	<p>Проверьте качество РНК с помощью гель-электрофореза. Учтите требования к качеству РНК, изложенные в протоколе Mint (#SK001). Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК.</p>
<p>Искомый транскрипт имеет длину более 5-6 т.п.н. и низкую концентрацию в образе кДНК. В этом случае при синтезе кДНК ревертаза не всегда успешно достраивает первую цепь кДНК до 5' конца, поэтому образец тотальной кДНК содержит 5'-концевых фрагментов меньше, чем 3'-концевых.</p>	<p>При исходно низком уровне экспрессии транскрипта 5'-концевые области могут практически не присутствовать в образце кДНК. Если известно, что целевой транскрипт имеет длину более 5-6 т.п.о., то для успешного проведения амплификации 5'-концевой последовательности при постановке реакции синтеза кДНК следует заменить олиго(dT)-содержащий праймер, отжигающийся на сайт полиаденирования, геноспецифическим праймером (5'rev0), направленным в сторону 5'-конца (см. Приложение II. «Выявление 5'-концевых последовательностей транскриптов длиной более 5-6 т.о» на стр. 30)</p>

4. Продукт ПЦР, разрешенный с помощью гель-электрофореза, выглядит как несколько полос

Возможная причина проблемы	Варианты решения
<p>Использованы неоптимальные условия ПЦР.</p>	<p>Иногда удается устранить появление лишних полос оптимизацией параметров ПЦР (увеличение температуры отжига праймеров на 2-5°C, снижение количества циклов ПЦР, изменение времени элонгации и т.п.). Осуществите оптимизацию параметров ПЦР как описано в инструкции к набору реактивов Encyclo PCR kit (#PK001) и повторите амплификацию.</p>

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Неспецифический продукт образуется с одного из геноспецифических праймеров.	Если в контрольной реакции образуется полоса (или несколько полос), которые присутствуют в опытном образце, это может свидетельствовать о том, что сайт отжига данного праймера не уникален. В этом случае нужно сменить геноспецифический праймер.
Неспецифический продукт образуется с одного из адаптерных праймеров.	Если в контрольной реакции с геноспецифическим праймером побочные продукты не образуются, поставьте контрольную реакцию с одним адаптерным праймером. Если адаптерный праймер вызывает образование неспецифического продукта, поднимите температуру отжига (если это позволяют условия реакции). Если это невозможно, требуется замена системы адаптерных смесей (обратитесь в службу технической поддержки customer-support@evrogen.ru).
Отжиг геноспецифического праймера происходит на константную область высокомолекулярных последовательностей, относящихся к одному генному семейству.	Осуществите клонирование и секвенирование каждой из полос.
Целевая РНК представлена рядом форм различной длины из-за наличия нескольких сайтов полиаденилирования, нескольких сайтов инициации транскрипции, альтернативного сплайсинга, аллельных вариантов.	Осуществите клонирование и секвенирование каждой из полос.

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
<p>Несколько полос соответствуют неполному транскрипту.</p>	<p>Преждевременная остановка синтеза кДНК ревертазой из-за сложной вторичной структуры РНК-матрицы или значительной длины целевого транскрипта (более 5 т.п.о.) может привести к образованию укороченных кДНК. Увеличьте количество матрицы в первом цикле амплификации в 5-10 раз. Если известно, что исследуемый транскрипт имеет длину более 5-6 т.п.о., то для успешного проведения амплификации 5'-концевой последовательности при постановке реакции синтеза кДНК следует заменить олиго(dT)-содержащий праймер, отжигающийся на сайт полиаденирования, геноспецифическим праймером (5' rev0), направленным в сторону 5'-конца (см. Приложение II. «Выявление 5'-концевых последовательностей транскриптов длиной более 5-6 т.о» на стр. 30).</p>

5. Продукт ПЦР, разрешенный с помощью гель-электрофореза, выглядит как одна или несколько полос на фоне диффузного неспецифического продукта ПЦР (шмера)

Возможная причина проблемы	Варианты решения
<p>Появление шмера только при 5'-RACE свидетельствует о частичной деградации РНК или кДНК.</p>	<p>Проверьте качество кДНК и РНК с помощью гель-электрофореза. Учтите требования к качеству РНК, изложенные в протоколе Mint (#SK001). Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Убедитесь, что ваши реагенты, рабочая зона и инструментарий не загрязнены нуклеазами. Приготовьте новый образец кДНК-матрицы.</p>

продолжение на следующей странице

Возможная причина проблемы	Варианты решения
<p>Если шмер появляется в продуктах ПЦР, полученных в ходе как 5'-, так и в 3'-RACE (особенно, во всех раундах амплификации), это свидетельствует о контаминации исходной РНК, образца кДНК или реагентов посторонней ДНК.</p>	<p>Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Для контроля контаминация реактивов и оборудования ДНК-матрицей, рекомендуется использовать контрольную реакцию с добавлением обоих праймеров, но без ДНК-матрицы. В случае контаминации следует заменить образец кДНК и загрязненные реактивы.</p>
<p>В образцах на всех раундах амплификации кроме специфических продуктов появляется высокомолекулярный продукт длиной более 5 т.п.о. (рис. 7).</p>	<p>Фоновая амплификация иногда появляется с адаптерных праймеров, особенно при использовании в ПЦР геноспецифического праймера с низкой температурой отжига. В этом случае целевой продукт ПЦР необходимо очистить через агарозный гель и клонировать индивидуальную полосу.</p>

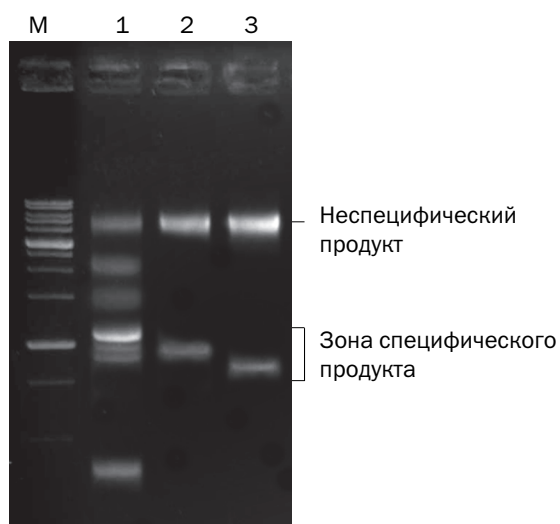


Рис. 7. Продукты амплификации, полученные после I, II и III раундов (1, 2, 3 дорожки, соответственно). Видно изменение длины специфического продукта ПЦР и постадийное обогащение. При этом не наблюдается изменения длины неспецифического продукта.

Приложение I.

Реамплификация фрагмента ДНК перед клонированием

- 1) Отберите в стерильную пробирку 2 мкл продукта ПЦР, полученного после последнего раунда амплификации или после элюции из агарозы.
 - ▶ *Перед взятием аликвоты образец ДНК, хранившийся при -20°C , прогрейте в течение 2 мин при 70°C для дезагрегации ДНК и затем перемешайте содержимое.*
- 2) Добавьте к аликвоте ПЦР-продукта 38 мкл стерильной воды.
- 3) Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:
 - 39 мкл Стерильная вода
 - 5 мкл 10X буфер для Encuslo
 - 1 мкл Смесь dNTP (10 мМ каждого)
 - 1 мкл Специфический праймер, использованный в последнем раунде RACE (10 мкМ)
 - 1 мкл Праймер M1 из набора Mint (10 мМ)
 - 1 мкл 50X Encuslo полимеразы
 - 2 мкл кДНК со стадии «Реамплификация фрагмента ДНК перед клонированием пункт 2»

50 мкл Суммарный объем

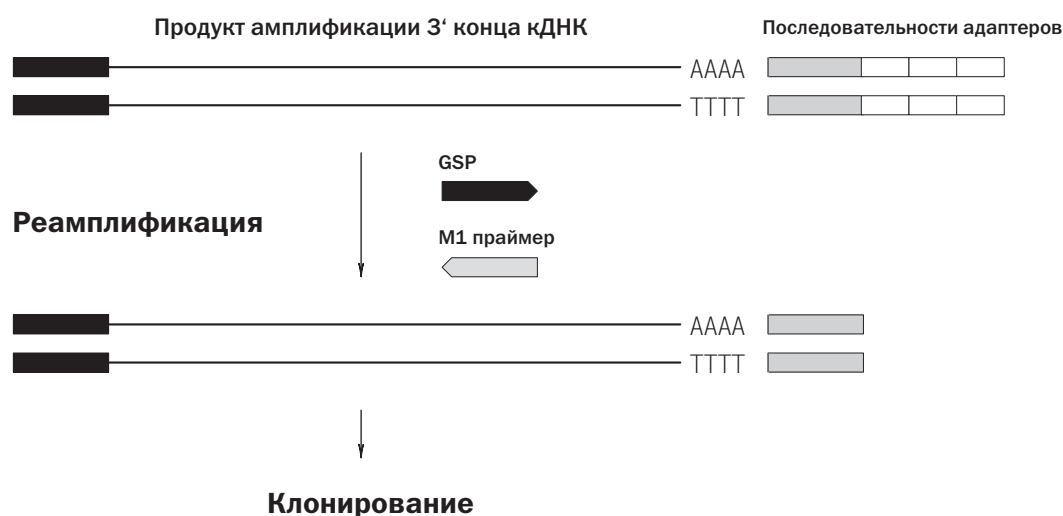


Рис. 8. Схема реамплификации продукта RACE перед клонированием. GSP - геноспецифический праймер.

- 4) Аккуратно перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
- 5) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки. Поместите пробирки в амплификатор.
- 6) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	10-12 циклов	$T_m \leq 66^\circ\text{C}$	20 сек
		72°C	3 мин

Температура отжига праймера $M1 = 66^\circ\text{C}$. Для приблизительного расчета температуры отжига геноспецифического праймера можно воспользоваться формулой: $T_m (^\circ\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$. В программе ПЦР следует использовать наименьшую из этих двух T_m .

- 7) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. Оставшийся продукт ПЦР поместите в лед. При необходимости добавьте 1-2 цикла ПЦР для наработки большего количества продукта.
- 8) Сразу по окончании амплификации произведите очистку продукта ПЦР и его клонирование.
 - ▶ Для клонирования в TA-вектор рекомендуется использовать только свежий ПЦР продукт. После амплификации пробирку помещают в лед, ДНК очищают на колонке и добавляют аликвоту в реакцию лигирования.

Приложение II.

Выявление 5'-концевых последовательностей транскриптов длиной более 5-6 т.о.

Если известно, что исследуемый транскрипт имеет длину более 5-6 т.п.о., то для успешного выявления 5'-концевой последовательности при постановке реакции синтеза кДНК следует заменить олиго(dT)-содержащий праймер, отжигающийся на сайт полиаденирования, геноспецифическим праймером (5'rev0), направленным в сторону 5'-конца. Это обеспечит дополнительное обогащение образца кДНК целевыми последовательностями.

- 1) Осуществите дизайн и синтез праймера 5'rev0 для инициации синтеза кДНК: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(X)₁₇₋₂₅-3', где (X)₁₇₋₂₅ – последовательность специфического праймера, направленного в сторону 5'-конца целевого гена.
 - ▶ На 5'-конец праймера 5'rev0 вводится последовательность (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC-3'), позволяющая осуществлять амплификацию кДНК с использованием праймера M1. 3'-концевая последовательность праймера должна быть комплементарна известной последовательности мРНК.
- 2) Осуществите синтез кДНК с помощью набора Mint (#SK001), добавив 1 мкл 5'rev0 праймера (15-20 мкМ) в реакцию синтеза вместо 3'-праймера (3'-primer).
 - ▶ При выполнении протокола Mint с использованием праймера 5'rev0 следует увеличить число циклов ПЦР при получении амплифицированной кДНК до 23-26.
- 3) Используйте полученную кДНК в качестве матрицы для первого раунда RACE (VI.2. «Подготовка матрицы кДНК» на стр. 11).
 - ▶ Геноспецифический праймер для первого раунда амплификации (5'rev1) должен быть сдвинут относительно праймера 5'rev0 в 5'-область целевой последовательности как минимум на 9-12 н.о.

Ссылки

1. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Research* 27(6): 1558-1560.

Для заметок

вер. 18 июля 2011 г.

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