

## SNPdetect полимераза

SNPdetect – высокоточная полимераза с горячим стартом, разработанная для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Фермент также может быть использован для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК длиной до 1000 п.о. с широкого спектра матриц.

### Область применения

- SNP генотипирование: аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель-специфичное удлинение праймера (AS-PEX), минисеквенирование
- Высокоспецифичные ПЦР, в том числе мультиплекс ПЦР
- Высокоточная амплификация фрагментов до 1000 п.о.
- ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей (SYBR Green I, EVA Green)

Кат. #	Кол-во	Состав
PK022	100 мкл, на 200 р-ций по 25 мкл	SNPdetect полимераза, 10 ед/мкл 100 мкл; 10x SNPdetect буфер с Mg <sup>2+</sup> , 600 мкл; 10x SNPdetect буфер без Mg <sup>2+</sup> , 600 мкл; 50 mM MgCl <sub>2</sub> , водный раствор, 300 мкл
PKT22*	20 мкл, на 40 р-ций по 25 мкл	SNPdetect полимераза, 10 ед/мкл 20 мкл; 10x SNPdetect буфер с Mg <sup>2+</sup> , 100 мкл

\* Тестовый образец, не предназначен для продажи.

Хранение и транспортировка: -20°C.

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

### Основные свойства фермента:

- 5'>3' ДНК-полимеразная активность
- отсутствие 5'>3' и 3'>5' экзонуклеазной активности
- высокая точность синтеза ДНК из дезокси- и дидезоксинуклеотидов
- высокая специфичность, низкий уровень фоновой амплификации
- быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95°C)
- возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор (TA-cloning)

### Ограничения к использованию

- Из-за отсутствия 5'>3' экзонуклеазной активности SNPdetect полимераза не может использоваться для ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами (TaqMan).
- Не рекомендуется использовать SNPdetect для амплификации фрагментов длиной свыше 1000 п.о.

## Приготовление реакционной смеси

Для SNP типирования в двух реакциях с разными аллель-специфическими праймерами приготовьте общую реакционную смесь объемом 50 мкл, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже.

Компонент	Количество на 50 мкл реакции	Конечная концентрация
Стерильная вода	до 50 мкл	-
10x реакционный буфер с Mg <sup>2+</sup>	5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	1X (0.2 мМ каждого)
Общий праймер (10 мкМ)	1 мкл	0.2 мкМ
ДНК-матрица	переменное	0.2 - 2 нг/мкл
SNPdetect полимеразы (10 ед./мкл)	0.5-1 мкл	0.1-0.2 ед./мкл

Перемешайте компоненты реакции, разнесите по 25 мкл реакционной смеси в две пробирки, в каждую добавьте по 0.5 мкл аллель-специфического праймера:

Компонент	пробирка #1 (25 мкл)	пробирка #2 (25 мкл)	Конечная концентрация
Аллель-специфический праймер 1 (5 - 10 мкМ)	0.5 мкл	-	0.1 - 0.2 мкМ
Аллель-специфический праймер 2 (5 - 10 мкМ)	-	0.5 мкл	0.1 - 0.2 мкМ

**SNPdetect полимеразы** неактивна при комнатной температуре. Фермент "активируется" после прогревания реакционной смеси в первом цикле денатурации.

Увеличение концентрации **аллель-специфических праймеров** в реакционной смеси выше 0,25 мкМ может снизить качество дискриминации SNP вариантов (уменьшить разницу между моментами появления детектируемого количества продукта в реакциях с разными аллель-специфическими праймерами).

**Количество ДНК-матрицы**, необходимой для успешной амплификации, зависит от качества ДНК, структуры ампликона, GC-состава, структуры праймеров и пр.

Рекомендуемое количество ДНК-матрицы для проведения стандартной ПЦР в объеме 25-50 мкл составляет 0.1 - 10 пг для плазмидной ДНК или амплифицированной ДНК или 1-100 нг для геномной ДНК или первой цепи кДНК.

Недостаточное количество матрицы, особенно геномной ДНК, может существенно снизить выход реакции. При увеличении количества матрицы специфичность реакции обычно сохраняется, а выход реакции увеличивается.

**Стандартная амплификация фрагментов ДНК** с парой встречных праймеров обычно ставится в объеме 25 мкл. Оптимальная концентрация праймеров в реакционной смеси 0,2 мкМ. Иногда (в частности, для мультиплекс ПЦР) требуется оптимизация концентрации праймеров в диапазоне от 0.05 до 0.8 мкМ.

### Оптимизация концентрации ионов Mg<sup>2+</sup>

10x SNPdetect буфер с Mg<sup>2+</sup> обеспечивает концентрацию магния в реакционной смеси, равную 2,5мМ. При этой концентрации, как правило, достигается эффективная дискриминация SNP. Однако, в отдельных случаях требуется дополнительный подбор концентрации ионов магния.

При необходимости оптимизации концентрации ионов  $Mg^{2+}$  используйте 10x SNPdetect буфер без магния. Мы рекомендуем поставить несколько реакций с различными концентрациями магния. В таблице ниже приведен расчет объема добавляемого раствора 50мМ  $MgCl_2$  для получения нужной концентрации ионов магния в реакционной смеси:

Добавляемый объем $MgCl_2$ (50 мМ) в 50 мкл реакционной смеси (мкл)	2.0	2.25	2.5	2.75	3.0	3.5	4.0
Конечная концентрация ионов магния в реакционной смеси (мМ)	2.0	2.25	2.5	2.75	3.0	3.5	4.0

В связи с тем, что магний является кофактором полимеразы, увеличение концентрации ионов  $Mg^{2+}$  увеличивает выход реакции, одновременно снижается её специфичность и растет неспецифическая (фоновая) амплификация.

### Параметры ПЦР

Для аллель-специфичной ПЦР важно подобрать параметры реакции для каждой группы аллель-специфических праймеров. Общие рекомендации по параметрам ПЦР приведены в таблице:

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	92-95°C	1 - 3 мин
Денатурация		92-95°C	5 сек - 1 мин
Отжиг	15-50	$T_m$ (55-68°C)	5 сек - 1 мин
Элонгация		72°C	1 мин на 1 т.п.о.

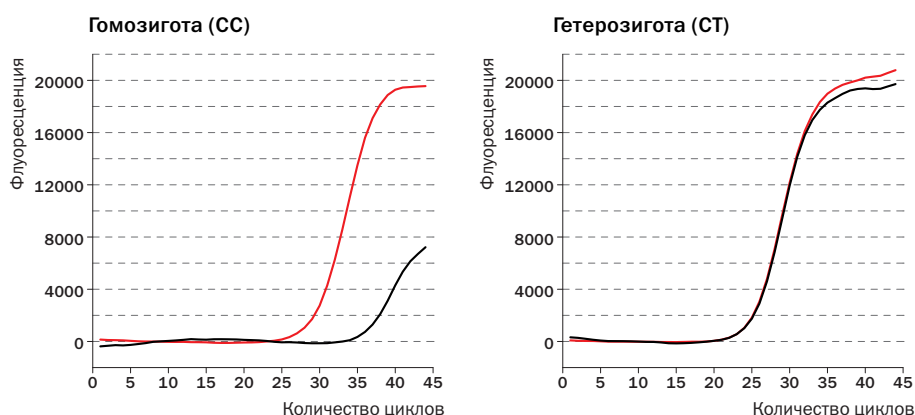
### Рекомендации по режиму амплификации

- Предварительная денатурация в течение 2-3 мин рекомендуется для геномной ДНК. В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0,5-1 мин.
- Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьирует от 55 до 72°C. Для приблизительного расчета температуры отжига ( $T_m$ ) можно воспользоваться формулой:  

$$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$
 Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев, повышение температуры отжига на пять градусов ( $T_m + 5°C$ ) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.
- Аллель-специфическую амплификацию намного удобнее производить на приборах для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SybrGreen I. В этом случае разница значения порогового цикла  $C_t$  (threshold cycle) для реакций с разными аллель-специфическими праймерами свидетельствует о наличии или отсутствии в матрице SNP. Увеличить разницу в эффективности реакций можно оптимизацией концентрации ионов  $Mg^{2+}$ .
- Метод детекции в агарозном геле по окончании реакции ("по конечной точке") требует оптимизации количества циклов ПЦР. Для каждой группы аллель-специфичных праймеров необходимо подобрать такие условия, при которых происходит эффективная амплификация с полностью комплементарного праймера, а

реакция с частично некомплементарного праймера не успевает перейти в экспоненциальную фазу.

- В случае наличия в ампликоне GC-богатых участков рекомендуется добавление DMSO до концентрации 5%, при этом температура отжига праймеров снижается на 2-3 градуса.



**Аллель-специфичная ПЦР с использованием SNPdetect полимеразы.** Анализ полиморфизма (С/Т) в человеческом гене KIR3 (геномная ДНК 5 нг) с праймерами: Праймер 1 («С» на 3'-конце) – красные линии на графиках; Праймер 2 («Т» на 3'-конце) – черные линии.

### Клонирование ПЦР-продуктов в ТА-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в ТА-вектор (например, в pAL-TA вектор, кат.# ТА001) благодаря выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам. Для клонирования нужно использовать свежеприготовленный ПЦР-продукт. Сразу после окончания амплификации пробирку с продуктом ПЦР следует поместить в лед. Так как использование неочищенного ПЦР-продукта сильно снижает эффективность клонирования, рекомендуется провести очистку ДНК на колонке или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением. В реакцию лигирования рекомендуется взять 100-200 нг ДНК.

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