

Информация о продукте

ПЦР Набор "Direct Plant"Для исследовательских работ *in vitro*

ПЦР ДНК растительных образцов, без выделения ДНК

Кат.№	Количество
PKDP-50	50 реакций
PKDP-100	100 реакций

Набор DirectPlant содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК непосредственно из растительных образцов.

Качество МастерМикса гарантируется на протяжении не менее 1 года, при хранении всех реактивов при -20°C Lysis буфер – хранить при +4°C

Внимание!

Перед использованием необходимо выдержать МастерМикс при комнатной температуре (~15 мин.).

Набор DirectPlant**1X:****2,5X Mas^{DP}Mix-3015**

Стабилизатор/энхансер

Красители для электрофореза (**Xylene Cyanol+Orange G**)Контрольные праймеры (**CHLf/CHLr**)«**Lysis буфер**» -5мл

(синяя крышка)

Описание:

Набор DirectPlant рекомендуется для проведения амплификации ДНК, из образцов растительной ткани без предварительного выделения ДНК.

Набор DirectPlant - смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

Основой **МастерМИКС^{DPa}** является термостабильная химерная **iQSTaq полимеразы**, обладающая высокой процессивностью, позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 80%.

iQSTaq полимеразы модифицирована путем внесения мутаций для повышения термоустойчивости фермента и резистентности к различным ингибиторам ПЦР, содержащимся в растительной ткани.

Использование **МастерМикса^{DP}** позволяет амплифицировать последовательности ДНК - до 1,2-1,5Kb для геномной ДНК непосредственно из образца растительной ткани, без предварительного выделения ДНК.

Для амплификации целевой ДНК можно использовать различные образцы тканей растительного происхождения, а также семена, плоды растений и другие объекты.

Высокая процессивность и термостабильность **iQSTaq полимеразы** позволяют значительно уменьшить время амплификации, сократив его практически в 2 раза.

МастерМикс^{DP} содержит оптимизированную концентрацию **MgCl₂**, которая достаточна для эффективной амплификации ДНК непосредственно из образца растительной ткани и экстрактов из растительных тканей.

Реакционная смесь, содержащая **МастерМикс^{DP}**, после проведения амплификации может быть нанесена непосредственно на гель, без проведения дополнительных манипуляций (добавления соответствующего буфера), что значительно сокращает время и экономит расходные материалы.

Протокол амплификации ДНК из растительных образцов, без выделения ДНК

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – т.к фермент не обладает активностью при комнатной температуре.

Приготовьте МастерМикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций. МастерМикс готовится из расчета – количество анализируемых образцов+2.

При проведении исследования обязательно амплифицируйте К- (отрицательный контроль), используя в качестве матрицы воду, добавляя ее в том же объеме, что и ДНК матрицу для исследования.

Смешайте следующие компоненты :

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз) 2,5X Mas^{DP}Mix-3015	до 50µL 20µL	до 25µL 10µL	1X
Праймеры	x	x	0.3-0.5 µM каждого
Образец растительной ткани* (для прямой амплификации)	1 – 1,5мм ²	0.5-1мм ²	
Образец экстракта из растительной ткани	0,5-2 мкл	0,25-1 мкл	

Рекомендованный объем проведения ПЦР реакции – 50 мкл.

В случае использования амплификации в другом конечном объеме, необходимо изменить пропорционально объемы всех реактивов, добавляемых в реакцию.

Рекомендуемые условия амплификации

	2-х стадийный ПЦР		3-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	Т°С	время	Т°С	время	
Начальная ¹⁾ денатурация	98°С	5 мин	98°С	5 мин	1
Денатурация Отжиг	98°С -	5-10 сек -	98°С 55-72²⁾	5-10 сек 10-15 сек	35-40
Элонгация	69-72°С³⁾	15 сек/Kb	72°С	15-30 сек/Kb²⁾	
Финальная элонгация	72°С 4°С	1-2 мин hold	72°С 4°С	1 мин hold	1

1.Обратите внимание

- необходимо использовать тщательно подготовленный (читый или одноразовый) инструмент для получения каждого образца растительной ткани;
- добавляйте образец ткани в реакционную смесь, внесенную в ПЦР пробирку, а не наоборот;
- для сложных образцов используйте вариант с экстракцией ДНК из образца. Этот подход предпочтителен для амплификации длинных ДНК матриц и для мультиплексной ПЦР;
- для первичной денатурации используйте 98°С – не снижайте температуру и не уменьшайте время – это может привести к проблемам в амплификации исследуемого образца;
- температура отжига праймеров при амплификации с **iQSTaq** полимеразой отличается от температур, используемых для амплификации с **Taq** полимеразой или ферментов на ее основе.

2. Амплификация растительных образцов

2.1. «Прямая амплификация» образцов листьев растений

Для проведения амплификации возьмите образец растительной ткани размером в 1-1,5мм². Используйте для этого скальпель.

Лучшие результаты можно получить используя свежие образцы растительной ткани. Возможно использование сухих и замороженных образцов.

Рекомендуется, при подготовке образца, получить его из центральной части листа, для лучшей экстракции ДНК из образца при проведении амплификации.

Обратите внимание, чтобы исходный образец не содержал дополнительных примесей других объектов и почвы.

Поместите подготовленный Вам образец непосредственно в пробирку для амплификации. Убедитесь, что исследуемый образец полностью находится в растворе. В случае необходимости центрифугируйте, для осаждения образца в реакционную смесь.

Проведите амплификацию в выбранном Вам режиме.

После проведения амплификации проанализируйте полученный результат, внося 1/5 реакционной смеси непосредственно в лунку подготовленного агарозного геля.

2.2 «Лизис-амплификация» образцов листьев растений

Для проведения экстракции ДНК из образца растительной ткани возьмите образец размером 1-1,5мм².

Внесите образец в чистую пробирку и добавьте 25 мкл «Lysis буфера». Обратите внимание, чтобы образец был полностью погружен в раствор. В случае использования большего образца, увеличьте количество буфера пропорционально.

Центрифугируйте образец в течение 5 мин. при комнатной температуре на скорости 13000 об.

Время проведения экстракции может быть увеличено до 10-15 минут. При этом следует помнить, что более продолжительная экстракция может привести к ко-экстракции значительного количества сопутствующих веществ, которые могут ингибировать ПЦР.

После проведения центрифугирования отберите раствор в объеме 10-15 мкл и перенесите в чистую пробирку. Для амплификации используйте 0,5-2 мкл экстракта в конечном объеме ПЦР реакции 50 мкл.

Добавьте образец в пробирку и проведите амплификацию в выбранном режиме.

После проведения амплификации проанализируйте полученный результат, внося 1/5 реакционной смеси непосредственно в лунку подготовленного агарозного геля.

3. Амплификация образцов семян и плодов.

3.1. «Прямая амплификация» образцов семян

При подготовке исследуемого образца семян необходимо очистить семя от оболочки и скальпелем отрезать образец размером 1мм (лучше всего использовать образец в виде кубика размером стороны 1мм).

Поместите образец в пробирку для амплификации. Обратите внимание, чтобы образец полностью был погружен в реакционную смесь. При необходимости центрифугируйте коротко.

Проведите амплификацию в выбранном Вам режиме.

После проведения амплификации проанализируйте результат, как указано в п.п.2.1 и 2.2.

3.2 «Лизис-амплификация» образцов семян

Для анализа образцов семян с использованием «Lysis буфера» поместите образец в пробирку, добавьте 25 мкл буфера и проведите экстракцию как указано в п.2.2.

После проведения экстракции добавьте образец экстракта к реакционной смеси и проведите амплификацию.

4. Использование других растительных образцов

В качестве объектов исследования могут быть использованы и другие растительные образцы – плоды растений, стебли и т.д.

При этом следует обратить внимание на качество образца, отсутствие примесей других объектов, что может привести к неправильной интерпретации результатов за счет контаминации образца ДНК других объектов.

5. Компоненты реакции

5.1 Фермент

iQStaq полимеразы, катализирует синтез цепи ДНК в направлении 5'→ 3' имеет слабую 3'→ 5' экзонуклеазную активность. Продукты амплификации имеют смесь «липких» и «тупых» концов.

Фермент в значительной степени резистентен к различным ПЦР ингибиторам.

5.2. Компоненты реакционного буфера

Реакционный буфер оптимизирован для работы с растительными образцами и содержит оптимальные количества дополнительных компонентов, позволяющих преодолеть ингибирующий эффект соединений, содержащихся в растительных образцах. Концентрация MgCl₂ подобрана оптимально для ПЦР с растительными образцами.

В реакционной смеси использованы высоко чистые dNTP's, что позволяет получать стабильные амплификационные результаты.

5.3. Инертные красители

Наличие в реакционной смеси двух красителей не влияет на качество и эффективность ПЦР. Дополнительным удобством является возможность нанесения анализируемого образца после амплификации непосредственно на гель, без дополнительного внесения буфера для электрофореза.

5.4 «Lysis буфер»

«Lysis буфер», применяемый для экстракции ДНК оптимизирован для использования с различными растительными образцами и позволяет в короткий срок (до 10 мин), при

комнатной температуре получить количество растительной ДНК, достаточного для проведения амплификации. «Lysis буфер» может использоваться для долговременного хранения выделенных образцов ДНК при -20°C, для их дальнейшего использования. 5мл «Lysis буфера» достаточно для проведения 200 выделений.

6. Подбор праймеров для ПЦР

6.1. Температура «отжига» праймеров

Рекомендованная концентрация праймеров в конечном объеме ПЦР реакции – 15пмоль каждого праймера. При проведении мультиплексной ПЦР может потребоваться дополнительная оптимизация концентрации всех праймеров.

Для праймеров с расчетной T_m до 62°C, рекомендовано проведение 3-х стадийной ПЦР. При этом, для праймеров, длиной >20н.п. рекомендуется использовать T_m+(3-5°C). Для получения наилучших результатов необходимо провести амплификацию в градиенте T_m, для более точного определения оптимальной температуры «отжига».

Для праймеров с высокой расчетной T_m от 64°C, рекомендовано проведение 2-х стадийной ПЦР. Для проведения амплификации с праймерами, указанными выше возможно использование совмещенной T отж/елонгации от 69 до 72°C. Температура 72°C оптимальна для праймеров с T_m>66°C.

6.2. Условия элонгации

Для амплифицируемых фрагментов длиной до 500н.п. рекомендуемое время элонгации не должно превышать 15 секунд. Для фрагментов до 1200 н.п. рекомендуемое время элонгации составляет 20 сек.

7. Контрольная реакция

Мы рекомендуем провести контрольную ПЦР реакцию «прямой» и «лизис» амплификации с контрольными праймерами, которые входят в состав набора.

В качестве матрицы необходимо использовать образцы растительной ткани, которая будет использоваться для проведения исследования в «прямой» и «лизис» амплификации.

В случае, если в контрольном опыте результат не получен, это может свидетельствовать о том, что предполагаемый образец не может быть использован в «прямой» и «лизис» амплификации.

Контрольные праймеры специфичны к высоко-консервативной последовательности хлоропластной ДНК. Размер ампликона 297 п.н. Концентрация праймеров 15 пмоль.мкл. каждого праймера.

Смешайте следующие компоненты для проведения амплификации с контрольными праймерами :

Компонент	50µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50мкл	
2,5X Mas ^{DP} Mix-3015	20мкл	1X
Праймеры	1+1 мкл	15 пмоль каждого
Образец растительной ткани* (для прямой амплификации)	1 – 1,5мм ²	
Образец экстракта из растительной ткани	0,5-2 мкл	

Рекомендованный объем проведения ПЦР реакции – 50 мкл.

В случае использования амплификации в другом конечном объеме, необходимо изменить пропорционально объемы всех реактивов, добавляемых в реакцию.

Рекомендуемые условия амплификации

	2-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	T°C	время	
Начальная ¹⁾ денатурация	98°C	5 мин	1
Денатурация	98°C	5 сек	40
Отжиг	-	-	
Элонгация	69°C	15 сек	
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	1
	4°C	hold	

После проведения амплификации и проведения гель-электрофореза, на геле обнаруживается целевой амплификат размером 297 н.п.