

Общество с дополнительной ответственностью
«ПРАЙМТЕХ»

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения РБ

В.Е.Шевчук

«21» 09 2010 г.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ СИНТЕТИЧЕСКИЕ
ТУ ВУ 190870984.001-2010

Инструкция по применению

СОГЛАСОВАНА

Первый заместитель директора РУП
«Центр экспертизы испытаний в
здравоохранении»,

С.И.Зинченко

«20» 09 2010 г.

СОГЛАСОВАНА

Директор ГУ «РНПЦ детской онко-
логии и гематологии»,

О.В. Алейникова

«03» 09 2010 г.

СОГЛАСОВАНА

Ректор ГУО «Белорусская медицин-
ская академия последипломного об-
разования»,

Ю.Е. Демидчик

«07» 09 2010 г.

РАЗРАБОТАНА

ОДО «Праймтех»,
директор,

В.Л. Сурвило

«27» 09 2010 г.

СОГЛАСОВАНА

Ректор УО «Гомельский государст-
венный медицинский университет»,

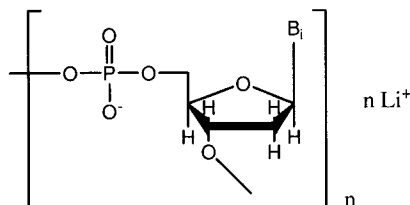
А.Н. Лызиков

«06» 09 2010 г.

Минск
2010

Инструкция предназначена для специалистов (медицинских учреждений, НИИ, ЦГЭ), занимающихся клинико-лабораторной диагностикой наследственных и инфекционных заболеваний или генетическим анализом методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Олигонуклеотиды представляют собой короткие фрагменты ДНК. Структурная формула:



где n — число звеньев в цепи (от 2 до ~200), а B_1 — одно из четырех нижеприведенных пуриновых или пиримидиновых оснований:

Аденин (A)	Гуанин (G)	Цитозин (C)	Тимин (T)

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и синтетическими олигонуклеотидами (праймерами). Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка. После гибридизации матрицы с праймером, последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица. T_m — температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Температуру плавления можно приблизительно определить по формуле:

$$T_m = 2 \cdot (n_A + n_T) + 4 \cdot (n_G + n_C),$$

где n_X — количество нуклеотидов X в праймере.

В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками

матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 С.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

- GC-состав ~ 40—60 %;
- близкие T_m праймеров (отличия не более чем на 5 С);
- отсутствие неспецифических вторичных структур – шпилек и димеров (определяются олигонуклеотидным составом);
- желательно, чтобы на 5'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

1. Количественный анализ олигонуклеотидов в растворе.

Определение количества олигонуклеотидов в растворе проводится методом спектрофотометрического анализа.

1.1. Материалы.

1. Исследуемый образец олигонуклеотида.
2. Деионизованная вода
3. Сменные одноразовые наконечники для автоматических пипеток объемом 400 – 1000 мкл

1.2. Оборудование.

1. Спектрофотометр
2. Прямоугольные кварцевые кюветы
3. Весы лабораторные класс точности с ценой деления 0,0001 г
4. Набор автоматических пипеток с измеряемым объёмом 400 – 1000 мкл

1.3. Протокол

Из пробирки, содержащей анализируемый раствор, с помощью микропипетки отбирают испытуемый раствор и помещают его в прямоугольную кварцевую кювету. В соответствии с инструкцией по эксплуатации спектрофотометра измеряют оптическую плотность раствора A_{260} на длине волны $\lambda=260$ нм, используя в качестве раствора сравнения дистиллированную воду. Процедуру повторяют три раза. За результат принимают среднее арифметическое трех параллельных определений. С помощью микропипетки отбирают испытуемый раствор из прямоугольной кварцевой кюветы и возвращают его в пробирку. Используя весы лабораторные, определяют массу всего анализируемого раствора M в граммах с точностью до второго десятичного знака.

1.4. Обработка результатов анализа.

Количество олигонуклеотидов C в исследуемом растворе в оптических единицах (о.е.) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A_{260} \times M}{b}$$

где b – толщина поглощающего свет слоя кварцевой кюветы в сантиметрах.

2. Проведение ПЦР

2.1. Материалы.

1. Олигонуклеотиды – прямой и обратный праймеры, комплементарные противоположным концам разных цепей амплифицируемого фрагмента ДНК (10 пмоль/мкл)
2. ДНК-матрица, содержащая участок ДНК, который требуется амплифицировать
3. Термостабильная *Taq* ДНК-полимераза (5 U/мкл)
4. Смесь (10X, 2 mM) дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
5. Стандартный буфер для ПЦР (10X)
6. Раствор $MgCl_2$ (50 mM)
7. Деионизованная вода
8. Минеральное масло (если используется термоциклер без подогрева крышки)

2.2. Оборудование.

1. Термоциклер (амплификатор)
2. Центрифуга для микропробирок
3. Встряхиватель (вортекс)
4. Набор автоматических пипеток с измеряемым объемом 0,5 – 50 мкл
5. Сменные одноразовые наконечники объемом 0,5 – 50 мкл
6. Стерильные пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,5 мл

2.3. Протокол

Ниже приведён протокол проведения ПЦР в объеме реакционной смеси 50 мкл. Можно также проводить ПЦР и в меньших объемах. Для этого необходимо уменьшить в соответствующее число раз приводимые ниже количества. Минимальный рекомендуемый объем реакционной смеси – 10 мкл, оптимальный – 25 мкл.

1. Приготовить 50 мкл следующей смеси. Все операции желательно проводить на льду.

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Стандартный калийхлоридный или сульфатаммонийный буфер (10X)	5	1X
Смесь (10X, 2 mM) дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	5	1X (200 мкМ)

Раствор $MgCl_2$ (50 мМ)	1,5 – 3	1,5 – 3 мМ <i>При меньших концентрациях $MgCl_2$ повышается точность фермента, но уменьшаются выходы продукта.</i>
Прямой праймер (10 пмоль/мкл)	0,5 – 2,5	1-5 пмоль/мкл
Обратный праймер (10 пмоль/мкл)	0,5 – 2,5	1-5 пмоль/мкл
ДНК матрица	Определяется пользователем	0,1-1 нг/мл плазмидной ДНК 1-10 мкг/мл геномной ДНК
<i>Taq</i> ДНК-полимераза (5 U/мкл)	0,2	0,02 U/μl
Деионизованная вода	Довести реакционную смесь до 50 мкл	

2. Аккуратно смешать все компоненты и центрифугировать 15 секунд. Если у амплификатора нет крышки с подогревом, добавить каплю минерального масла.

3. Условия проведения ПЦР

Начальная денатурация	95°C	30 секунд – 5 минут
20-30 циклов	95°C	15 – 30 секунд
	40°C – 72°C	15 – 30 секунд
	72°C	1 минута на 1000 пар оснований ампликона
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

3. Анализ результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

3.1. Материалы.

1. Агароза
2. ТАЕ-буфер (50X)
3. Бромистый этидий
4. Деионизованная вода
5. Буфер для загрузки образцов в гель (6X)
6. ДНК-маркер

3.2. Оборудование.

1. СВЧ-печь
2. Камера для вертикального электрофореза
3. Источник питания

4. Трансиллюминатор

3.3. Приготовление агарозного геля.

В колбу коническую термостойкую вместимостью 250 мл внести 2,0 г агарозы, добавить 2,0 мл 50-кратного ТАЕ-буфера и 100 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

Колбу поместить в СВЧ-печь, довести содержимое до кипения и после того, как агароза полностью растворится, колбу с расплавленной агарозой вынуть из печи. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным и не содержать отдельных нерасплавленных частиц.

В колбу с расплавленной агарозой внести 10 мкл 1% раствора бромистого этидия и тщательно перемешать содержимое колбы равномерными вращательными движениями.

Расплавленную агарозу охладить до температуры примерно 50-60°C при комнатной температуре (18-25°C).

Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образца установить гребенку на планшет для заливки геля и зафиксировать гребенку с помощью зажимов. Расплавленную агарозу, охлажденную до температуры 50-60°C, залить в планшет. После застывания агарозы (примерно через 30 мин) осторожно вынуть гребенку и перенести планшет с гелем на стол электрофоретической камеры.

В ванночку прибора для электрофореза залить 500 мл разведенного буферного раствора для электрофореза.

3.4. Проведение электрофореза.

В лунки агарозного геля внести по 10 мкл амплификата в загрузочном буфере из соответствующих пробирок. На отдельную дорожку нанести 4 мкл препарата ДНК-маркера. Гель поместить в камеру для электрофореза, подключить камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля.

Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода к аноду. Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя, входящего в состав загрузочного буфера (краситель бромфеноловый синий должен пройти от старта 5-7 см).

Камеру отключить от источника питания, вынуть планшет с гелем, извлечь гель из планшета и осторожно перенести гель на стекло трансиллюминатора.

Примечание. Следует обязательно работать в резиновых перчатках!

Включить трансиллюминатор и проанализировать гель.