

# 1. Введение

Пограничник – простой метод для поиска неизвестных последовательностей ДНК, граничащих с известными, например в кДНК. Наборы Пограничник предназначены для использования на геномах любой сложности и является усовершенствованным аналогом наборов подобных GenomeWalker.

Первым этапом является фрагментирование геномной ДНК. Геномная ДНК должна быть чистой и высокомолекулярной, и требует чистоты выделения достаточной для проведения ферментативных реакций (рестрикция, лигирование, ПЦР), использование частично деградированной ДНК (фрагменты препарата тотальной ДНК менее 5 тыс. п.н.) возможно, однако, может приводить к образованию дополнительных целевых укороченных фрагментов в ходе использования набора, при этом уменьшать длину прочтения за один шаг. Для проверки качества вашей ДНК, в набор включен специальный контроль.

Аликвоты геномной ДНК по отдельности обрабатываются рестриктазами из набора, дающими тупые и различные липкие концы, до достижения полного переваривания. В несложных геномах частичное переваривание в отдельных случаях может приводить к увеличению длины прочтения за один шаг. В Пограничник входит набор из пяти рестриктаз, это BamHI, XbaI, XhoI, HindIII, EcoRI, однако, могут использоваться и другие рестриктазы, дающие фрагменты с и липкими концами идентичными перечисленным выше рестриктазам и с тупыми концами, при этом необходимо строго следить за соответствием последовательности получаемого липкого конца и используемого для дальнейшего лигирования адаптера. Наборы продуктов рестрикции по отдельности лигируются со специальными адаптерами. Подготовленные таким образом фрагменты ДНК в дальнейшем для удобства будем называть «библиотекой».

После того, как библиотеки сконструированы, дальнейшие действия занимают два дня и заключаются в двух последовательных ПЦР, которые ставятся на каждой из библиотек. Первая ПЦР проводится со внешнего праймера для адаптера GWA\_Ext (поставляется в наборе) и внешнего геноспецифичного праймера GSP1, который разрабатывается исследователем. Продукты первой ПЦР разбавляются и используются как матрица для второй ПЦР со вложенными праймерами - адаптерным GWA\_Int и геноспецифичным GSP2. В конечном итоге это приводит к получению целевых ПЦР-продуктов, как минимум с трех библиотек из пяти. Каждый фрагмент, который начинается с 5'-конца GWA\_Int и продолжается в прилежащую неизвестную область, может быть затем клонирован для дальнейшего изучения.

Кроме того, набор содержит геномную ДНК, которая используется в качестве положительного контроля при создании библиотек, а также, заранее сконструированную библиотеку на основе геномной ДНК, используемую как положительный контроль для ПЦР. На рис. 1 показаны типичные результаты первой и второй ПЦР с этими положительными контролями. ПЦР с праймерами для адаптеров и праймерами (LVr1 и LVr2) тестерной геномной ДНК на матрице библиотеки EcoRI должна давать продукт 0,5 т.п.н. длиной.

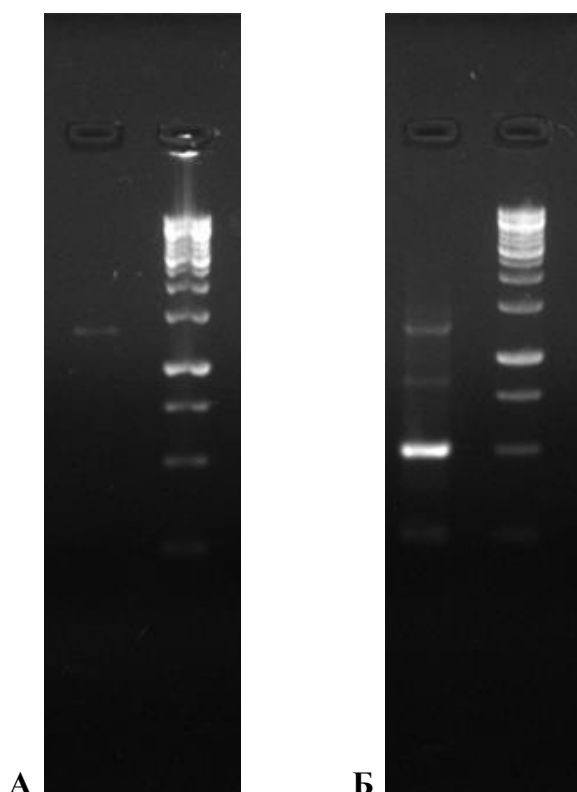


Рис.1

ПЦР с праймерами для адаптеров и праймерами (LVr1 и LVr2) тестерной геномной ДНК на матрице библиотеки EcoRI

А. ПЦР первого раунда с праймерами GWA\_Ext и LVr1

Б. ПЦР второго раунда с праймерами GWA\_Int и LVr2

В набор входит термостабильная “Как-то Taq” полимеразы производства компании Бигль. Пограничник химически модифицирован и адаптирован и для использования с высокоточными и/или обеспечивающими длинное прочтение полимеразы или смесями полимераз, обладающими 3’-5’ экзонуклеазной активностью, например “Фурия”, “Beagle Pfu” и “Д” полимеразы производства компании Бигль (высокоточные полимеразы в набор не входят). В этом случае в ПЦР используется смесь двух термостабильных полимераз, что улучшает эффективность и точность ПЦР. Большая часть работы на этапе элонгации выполняется первой полимеразой (в данном случае Taq), а вторая полимеразы (в нашем случае это Pfu полимеразы) обеспечивает коррекцию ошибок за счет 3’-5’ экзонуклеазной активности.

В протоколе Пограничник применение ПЦР дальнего чтения увеличивает возможный размер ПЦР- продуктов до 6 т.п.н. Мы рекомендуем использовать “Д” полимеразу компании Бигль, которая специально разработана для ПЦР дальнего чтения на матрице. “Как-то Taq” “Фурия” и “Д” полимеразы использовались для оптимизации протоколов для данного набора. Эти полимеразы можно приобрести отдельно или в виде набора для проведения ПЦР <http://www.biobeagle.com/ru/products.html>  
<http://www.biobeagle.com/ru/products/kits/pcr-kit.html>

Применение

Набор Пограничник позволяет исследователям использовать неклонированные библиотеки для «прогулок по хромосоме» на любой геномной ДНК. Метод позволяет меньше чем за неделю получить доступ к последовательностям, граничащим с известной ДНК, в геноме любого вида. С помощью набора можно изучать последовательность промоторов, картировать интрон-экзонные границы и изучать последовательности в обоих направлениях от маркеров типа Sequence Tagged Site (STS) и Expressed Sequence Tag (EST). Несмотря на ограничение длины одного шага в 6 кб, можно соединять множество шагов для изучения длинных последовательностей. Данный метод полезен для заполнения пробелов в геномных картах, в частности в случаях, когда отсутствующие клоны не удастся получить классическим скринингом библиотек. ПЦР-продукты получаемые с помощью набора Пограничник в целом достаточно чисты для рестрикционного картирования без клонирования. Обсуждение клонирования ПЦР-продуктов Пограничника и тестирования их на промоторную активность приводятся в конце описания.

## **II. Список компонентов.**

Храните геномную ДНК при 40С, а остальные компоненты – при -20оС.

Данных реактивов достаточно для трехкратного изготовления пяти библиотек Пограничника. Каждой библиотеки хватит на 80 реакций.

- 1) Рестриктазы и буферы к ним (активность всех ферментов – 10 е.а.мкл, все буферы – 10х)
  - 30 мкл EcoRI и 50 мкл буфера для неё.
  - 15 мкл BamHI и 50 мкл буфера для неё.
  - 15 мкл , XbaI и 50 мкл буфера для неё
  - 15 мкл XhoI и 50 мкл буфера для неё.
  - 15 мкл HindIII и 50 мкл буфера для неё.
  - 15 мкл SmaI и 50 мкл буфера для неё.
- 2) 75 мкл контрольной геномной ДНК (0,1 мкг.мкл)
- 3) 10 мкл T4 ДНК-лигазы (6 е.а..мкл)
- 4) 36 мкл Адаптера (25мкМ)
- 5) 250 мкл I Праймера для адаптера (GWA\_Ext, 10 мкМ)
- 6) 250 мкл II Праймера для адаптера (GWA\_Int, 10 мкМ)
- 7) 10 мкл библиотеки контрольной геномной ДНК (положительный контроль)
- 8) 50 мкл контрольного праймера LVr1 (10 мкМ)
- 9) 50 мкл контрольного праймера и LVr2 (10 мкМ)
- 10) 2x1мл 10х буфера для “Как-то Taq”, “Фурия” и “Д” полимеразы – это такой же буфер, как в наборе “Как-то Taq”, “Фурия” и “Д” полимеразы компании Бигль, рекомендуемом в качестве источника полимеразы для экспериментов с Пограничником.
- 11) 200 мкл 25мМ ацетата магния

## **III. Дополнительные материалы.**

Данные реактивы необходимы, но не поставляются с набором:

- Хлороформ
- Гликоген (10мкг/мкл)
- 3М ацетат натрия

- 95% этиловый спирт
- 80% этиловый спирт
- TE-буфер (10мМ Трис, 0,1мМ ЭДТА рН=7,5)
- TE-буфер (10мМ Трис, 1мМ ЭДТА рН=7,5)
- 0,5X TBE или TAE
- “Д” полимеразы

Вам нужна смесь полимераз, основанная на Taq полимеразе и пригодная для ПЦР протяженных фрагментов. Обычная ПЦР с одиночной полимеразой дает удовлетворительные результаты для получения ПЦР-продуктов в большинстве экспериментов с использованием набора, однако может давать сбои при амплификации протяженных фрагментов, потенциально появляющихся в ходе использования набора. Протокол Пограничник оптимизирован под “Д” полимеразу. Данная смесь ферментов специально разработана компанией “Бигль” для амплификации протяженной геномной ДНК. Данная смесь содержит Taq-полимеразу в качестве основной, небольшое количество полимеразы с редактирующей активностью. “Д” полимеразы продается отдельно.

В качестве альтернативы допускается использование “Как-то Taq” полимеразы. Мы настоятельно рекомендуем использовать какой-либо способ обеспечения ПЦР в режиме hot-start. Для этого просто добавьте необходимое количество ацетата магния после прогрева и денатурации ПЦР смеси.

10X реакционный буфер.

Если вы используете в качестве источника полимеразы что-то отличное от “Как-то Taq”, “Фурия” и “Д” полимеразы, используйте ПЦР-буфер, поставляемый вместе с набором Пограничник.

Трифосфаты нуклеотидов.

10мМ раствор дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ. Хранить при -20оС.

Деионизованная вода

1-кб маркер молекулярного веса.

## **IV. Конструирование геномных библиотек.**

### **A. Общие соображения**

1.Создание библиотек должно начинаться с чистой, достаточно высокомолекулярной геномной ДНК. Требуется более качественное её приготовления, чем необходимо для ДНК-ДНК-гибридизации или обычной ПЦР. Процедуры выделения геномной ДНК можно найти в разных руководствах, однако имейте в виду, что методы различаются для организмов разных видов. Чтобы убедиться, что ваша ДНК приемлемого качества, повторите процедуру, описанную в разделе IV-Б.

2. Держитесь подальше от ПЦР-продуктов и не работайте с оборудованием, которое с ними контактировало.

3.Используйте только деионизованную воду.

4.В наборе присутствует геномная тестерная ДНК и специфичные праймеры LVr1 и LVr2 в качестве положительного контроля для проверки работоспособности всей системы

5. Протокол разработан для создания шести библиотек с экспериментальной геномной ДНК и одной контрольной библиотеки EcoRI.

#### Б. Качество геномной ДНК.

1. Проверьте размер геномной ДНК с помощью агарозного электрофореза. Нанесите 1мкл экспериментальной геномной ДНК в концентрации 0,1мкг/мкл и 1мкл контрольной ДНК такой-же концентрации, а также маркер молекулярного веса вроде 1 kb DNA ladder (Fermentas) или HindIII-гидролизата фага лямбда на 0,5% агарозный гель с TBE-буфером. ДНК должна состоять из фрагментов длиной не менее 50 т.п.н. и давать минимум шмера.

2. проверьте чистоту ДНК с помощью рестрикции EcoRI.

Смешайте:

5 мкл геномной ДНК,

1,6мкл EcoRI (10e.a.\мкл),

2 мкл 10x буфера для рестрикции

11,4мкл деионизованной воды,

а также сделайте аналогичную смесь без фермента. После инкубации в течение ночи на 37°C нанесите 5мкл смеси на 0,5% агарозный гель. На фореze в экспериментальном образце должен наблюдаться шмер, свидетельствующий о пригодности ДНК к рестрикции.

#### В. Рестрикция геномной ДНК.

В ходе каждого акта создания библиотеки вы должны поставить шесть реакций – пять реакций на экспериментальной геномной ДНК с пятью разными рестриктазами и одну контрольную рестрикцию с геномной ДНК Льянки обыкновенной и рестриктазой EcoRI.

1. подпишите шесть 1,5 мл пробирок и положительный контроль.

2. В каждой пробирке смешайте:

12,5 мкл геномной ДНК (0,1мкг/мкл)

4 мкл фермента рестрикции

5 мкл буфера для рестрикции

28,5 мкл дистиллята

Смешивание нужно производить аккуратно. Не использовать вортекс – это приведет к фрагментации ДНК

3. Инкубируйте при 37°C в течение 2ч.

4. Центрифугируйте пробирки на низкой скорости (5-10сек), после чего верните на 37°C и оставьте на ночь.

5. Отберите 2 мкл из каждой пробирки и проверьте успешность рестрикции с помощью электрофореза в агарозном геле. Вы можете также сохранить дополнительную аликвоту каждого из образцов для использования в качестве контроля потерь ДНК при очистке

6.

#### Г. Очистка ДНК.

1. Добавьте в каждую пробирку 40мкл хлороформа

2. Перемешайте на вортексе на низкой скорости (5-10сек)

3. С помощью непродолжительного центрифугирования отделите водную фазу от органической.
4. Перенесите верхнюю (водную) фазу в новые пробирки
5. Добавьте в каждую пробирку 2 объема (190 мкл) 95% этанола, 1/10 объема (9,5 мкл) 3М ацетата натрия (pH=4,5) и 20 мкг гликогена
6. Перемешайте на вортексе на низкой скорости (5-10сек)
7. Центрифугируйте при 15000 об/мин в течение 10 мин.
8. Слейте супернатант, промойте осадок 100 мкл 80% этанола
9. Центрифугируйте при 15000 об/мин в течение 5 мин.
10. Слейте супернатант, высушите осадок.
11. Растворите осадок в 10 мкл деионизованной воды.
12. Перемешайте на вортексе на низкой скорости (5-10сек)
13. Отберите 1 мкл из каждой пробирки и оцените количество ДНК после очистки.

#### Д. Лигирование адаптеров.

Реакции лигирования также ставятся для каждой из пяти библиотек.

1. В каждой из пяти пробирок смешайте:

2 мкл ДНК библиотеки  
4 мкл Адаптера (10 мкМ)  
1,6 мкл 10X буфера для лигазы

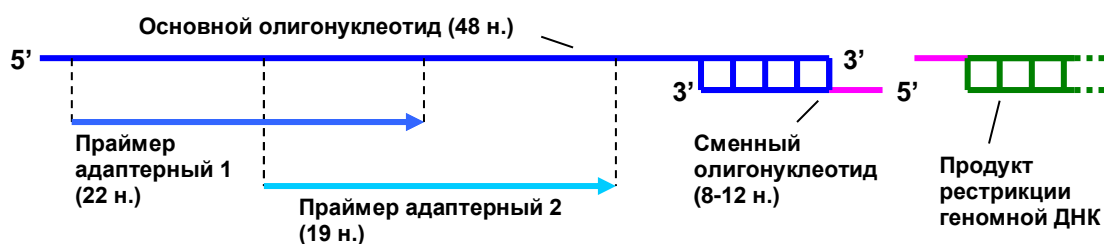
2. Нагрейте пробирки до 45°C, затем охладите на льду
3. В каждую пробирку добавьте 0,5 мкл лигазы
4. Инкубируйте при 16°C ночь, затем пробирки прогрейте 5 мин при 70°C.

## Раздел V. ПЦР

#### А. Подбор праймеров.

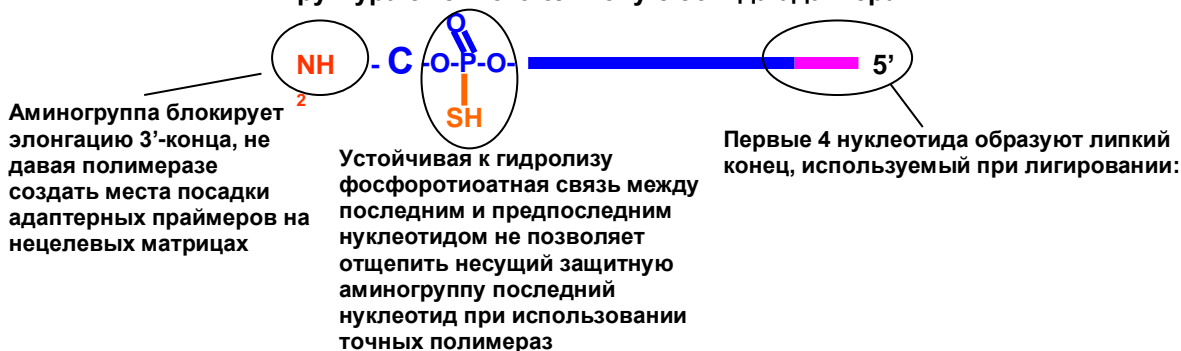
Вам необходимо подобрать два геноспецифичных праймера – один для первой ПЦР (GSP1), второй – для второй ПЦР (GSP2). Вложенный праймер GSP2 должен отжигаться на матрицу после 3'-конца праймера GSP1.

## Компоненты адаптера и праймеры адаптера



Адаптерные праймеры 1 и 2 отжигаются на цепь, комплементарную основному олигонуклеотиду адаптера. Эта цепь появляется только при амплификации с целевого праймера, т.к. 3'-конец сменного олигонуклеотида заблокирован

## Структура сменного олигонуклеотида адаптера



Внешний и внутренний праймеры не должны перекрываться, если это возможно. Если сделать так не удастся, необходимо, чтобы 3'-конец вложенного (GSP2) праймера имел как можно более уникальную последовательность.

В общем, оба праймера должны располагаться как можно ближе к концу известной части последовательности. Для изучения последовательности выше по течению от кДНК нужно, чтобы праймеры были по возможности максимально близки к 5'-концу гена. В идеале, они должны располагаться в первом экзоне гена. Если праймеры подобраны к дальним экзонам, целевые ПЦР-продукты будут с меньшей вероятностью содержать промоторную область из-за включения других экзонов и интронов длиной в несколько т.п.н.

Геноспецифические праймеры должны состоять из 26-30 н. и иметь ГЦ-состав порядка 40-60%. Даже если температура отжига кажется высокой, не делайте праймеров короче 26 н. Мы, как правило, используем праймеры длиной 27 н.

Это гарантирует эффективный отжиг праймеров на матрицу при рекомендуемой температуре отжига и элонгации (67°C). Праймеры не должны образовывать вторичные структуры, 3'-конец этих праймеров не должен отжигаться на 3'-конец адаптерных праймеров. Кроме того, среди последних 6 нуклеотидов не должно быть более трех гуанинов или цитозинов.

Адаптеры содержат 5 сайтов рестрикции (рестрикция с образованием липких концов: BamHI, XbaI, XhoI, EcoRI, HindIII с образованием тупых концов – SmaI). Эти сайты позволяют встраивать ПЦР-продукты в популярные вектора для изучения промоторов. Если вам нужны какие-то другие рестрикционные сайты, их можно ввести в 5'-конец праймера GSP2. Кроме того, имеется возможность клонирования ПЦР-продуктов в любой другой вектор по рестрикционным сайтам или с помощью T/A-клонирования по

адениновым нуклеотидам (только в случае использования для работы набора Taq полимеразы).

## Б. Общие рекомендации.

### 1. Параметры термоциклирования.

Параметры термоциклирования в данном протоколе были проверены на различных амплификаторах и оптимизированы с использованием реактивов и праймеров, поставляемых с набором. Однако, оптимальные параметры могут несколько варьировать в зависимости от различных полимеразных смесей, последовательностей геноспецифичных праймеров и используемого прибора. В разделе VI (пособие по устранению затруднений) содержится информация по оптимизации условий реакции.

### 2. Используйте какую-либо разновидность hot-start'a.

Важно использовать какой-нибудь вариант организации hot-start'a. в наиболее простом способе вносите ПЦР буфер, содержащий  $Mg^{2+}$  после полного прогрева реакционной смеси.

### 3. ПЦР со ступенчатым снижением температуры отжига.

В протоколе используется вариант ПЦР со ступенчатым снижением температуры отжига (Don et al, 1991; Roux, 1995, Hecker and Roux, 1996). Идея заключается в том, что на начальных циклах используется температура отжига/элонгации на несколько градусов выше температуры плавления праймеров. Хотя при более высокой температуре отжиг праймеров менее эффективен, он намного более специфичен. Повышенная температура также усиливает эффект супрессии ПЦР (см приложение Б), позволяя накопиться критическому количеству геноспецифичных продуктов. Затем температура отжига/элонгации снижается до значений, несколько меньших чем  $T_m$  праймера, обеспечивая эффективную экспоненциальную амплификацию геноспецифичного продукта. Как отмечено выше, мы рекомендуем использовать праймеры с температурой отжига более 68°C, чтобы вы смогли использовать программы со ступенчатым снижением температуры, которые описаны в данном протоколе.

### 4. Использование положительных контролей.

Предполагается, что в каждом эксперименте вы используете положительный контроль, подразумевающий амплификацию поставляемой контрольной библиотеки с контрольными праймерами (LVr1 и LVr2). Это позволит убедиться в работоспособности полимеразы и совместимости условий термоциклирования с протоколом Пограничник.

### 5. Амплифицируйте все библиотеки с каждым набором геноспецифичных праймеров.

Для повышения шансов на успех мы рекомендуем проводить амплификацию всех библиотек с каждым новым геноспецифичным праймером.

### 6. Используйте ферменты в рекомендованных количествах

Количества ферментов тщательно оптимизированы под протокол и реактивы набора Пограничник.

## В. Процедура ПЦР

Протокол прогулки по хромосоме состоит в постановке восьми ПЦР первого и восьми реакций второго раунда ПЦР, каждый из которых включает в себя шесть



экспериментальных и две контрольные реакции (положительный контроль на тестерной матрице и отрицательный контроль без матриц). Для положительных контрольных реакций следует использовать специальные контрольные праймеры (LVr1 и LVr2). В качестве матрицы в ПЦР первого раунда используйте 1 мкл библиотеки, в ПЦР второго раунда -

1 мкл разбавленных в 50 раз ПЦР-продуктов раунда 1.

1. Подпишите пробирки для ПЦР.

5. Приготовьте достаточное количество смеси для **ПЦР первого раунда** (из расчета на 8 реакций). Смешайте в пробирке для ПЦР следующие реактивы из расчета конечного объема реакции 20 мкл.

Расчет на одну реакцию:

Деионизованная вода – 13 мкл

10X буфер для полимераз (без магния) – 2

5мМ dNTP – 1 мкл

10мкМ Праймер адаптера 1 (GWA\_Ext) – 0,5 мкл

Смесь Pfu/Taq 1:10 – 1 мкл

Хорошо перемешайте смесь (но без образования пузырей) на вортексе, затем произведите короткое центрифугирование на микроцентрифуге.

6. Разлейте смесь по пробиркам по 17,5 мкл в каждую.

7. Добавьте в каждую пробирку по 0,5 мкл второго праймера. В пробирки с экспериментальными реакциями нужно добавить геноспецифичный праймер I (GSP1), в контрольные – контрольный праймер I (LVr1)

8. Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок с отрицательным контролем) 1 мкл соответствующих библиотек. В пробирки с отрицательным контролем не нужно добавлять ничего.

9. Добавьте в пробирки с отрицательным контролем 1 мкл воды.

10. Наслоите минеральное масло поверх реакционных смесей, закройте крышки.

11. Соберите капли центрифугированием.

12. Поместите пробирки в термоциклер и запустите следующую программу:

7 циклов:

94°C 25 сек.

72°C 3 мин

32 цикла:

94°C 25 сек

67°C 3 мин

Дополнительно

67°C 7 мин

Как только температура реакционной смеси достигнет 94°C внесите в каждую пробирку под масло по 1 мкл 25мМ MgCl<sub>2</sub>.

Важно: не используйте трехстадийных программ (например 95°C-50°C-72°C).

13. Оценивать ПЦР-продукт первого раунда на агарозном геле не обязательно. Отсутствие продукта или слабый продукт не является критичным успешности проведения дальнейших реакций. Тем не менее, для повышения контролируемости всех этапов, мы рекомендуем нанести 3 мкл ПЦР продукта первого раунда на 1% агарозный гель.

Ожидаемые результаты ПЦР первого раунда:

Во всех дорожках. За исключением отрицательных контролей, должны быть полосы. Обратите внимание, что они могут размытыми или быть множественными. Если с геноспецифичным праймером получился ПЦР-продукт, дающий на геле шмер или любые полосы, ставьте с ним ПЦР второго раунда, даже если полосы бледнее, чем положительный контроль.

Если видимого продукта не получилось ни с одной из библиотек, смотрите раздел «Руководство по устранению затруднений»

14. Приготовьте смесь для **ПЦР второго раунда**.

Расчет на одну реакцию:

Деионизованная вода – 14 мкл

10X буфер для Taq-полимеразы (без магния) – 2

5мМ dNTP – 1 мкл

10мкМ Праймер адаптера 1 (GWA\_Int) – 0,5 мкл

Taq-полимераза 1:10 – 1 мкл

Хорошо перемешайте смесь (но без образования пузырей) на вортексе, затем произведите короткое центрифугирование на микроцентрифуге

15. Разлейте смесь по пробиркам по 18 мкл в каждую.

16. Добавьте в каждую пробирку по 0,5 мкл праймера. В пробирки с экспериментальными реакциями нужно добавить геноспецифичный праймер II (GSP2), в контрольные – контрольный праймер II(LVr1)

17. Добавьте в каждую пробирку (включая контрольные) 0,5 мкл соответствующих ПЦР-продуктов первого раундов.

18. Раскапайте по пробиркам минеральное масло, закройте крышки.

19. Произведите непродолжительное центрифугирование.

20. Поместите пробирки в термоциклер и запустите следующую программу:

5 циклов:

94°C 25 сек

72°C 3 мин

20 циклов:

94°C 25 сек

67°C 3 мин

Дополнительно:

67°C 7 мин

Как только температура реакционной смеси достигнет 94°C внесите в каждую пробирку под масло по 1 мкл 25мМ MgCl<sub>2</sub>.

Важно: не используйте трехстадийных программ (например 95°C -50°C -72°C).

21. Оцените ПЦР-продукт, нанеся 3 мкл на 1,5% агарозный гель

Во время анализа на электрофорезе уберите продукты ПЦР второго раунда на +4°C до тех пор, пока не будет выяснено, что с ними всё в порядке. После этого, можно начинать их анализ и клонирование.

## **VI. Ожидаемые результаты и устранение неполадок.**

1. ПЦР первого раунда.

Пример геля с результатами ПЦР первого этапа показан на рис 2. в разделе «Введение». В общем, ПЦР первого этапа должна давать множественные фрагменты размером от 500 до 5000 п.н. В некоторых дорожках может быть заметен шмер. В случае наличия шмера или полос любой длины следует ставить ПЦР второго раунда.

2. ПЦР второго раунда

А) положительный контроль (LVr1 и LVr2).

ПЦР с праймерами для адаптеров и праймерами (LVr1 и LVr2) тестерной геномной ДНК на матрице библиотеки EcoRI должна давать продукт 0,5т.п.н. длиной.

Приблизительно в половине случаев одиночные полосы высокой концентрации наблюдаются со всеми шестью библиотеками. Длина каждого конкретного фрагмента зависит от расположения рестриционных сайтов в вашем фрагменте. Как правило, размер продуктов варьирует от 0,2 до 6 т.п.н. Фрагменты длиной менее 200 п.н. на 1% агарозном геле могут выглядеть как низкомолекулярный шмер. В этом случае следует использовать 2% агарозный гель.

Судя по нашему опыту, примерно в половине случаев ПЦР второго раунда не дает ПЦР-продуктов с одной или несколькими библиотеками. Как правило это вызвано тем, что расстояние между праймером и сайтом рестрикции превышает емкость системы (6 т.п.н.) Этот предел связан с падением эффективности эффекта подавления ПЦР (см. приложение Б). Фрагменты длиной более 6 т.п.н. также становятся неразличимы на фоне шмера, создаваемого высокомолекулярными продуктами. Аналогичный шмер также может возникать и в случае наличия полосы целевого продукта, в этом случае он не влияет целевой продукт. Отсутствие продукта в ПЦР с одной или нескольких библиотек не означает, что продукты, полученные с помощью других библиотек, некорректны.

Б. Устранение неполадок.

1. Отсутствуют ПЦР продукты с контрольных праймеров. Повышение числа циклов до 37 не устраняет проблему..

а) уменьшите температуру отжига/элонгации на 2оС (с 72 до 70, с 67 до 65)

б) Уменьшите длину этапа денатурации (94оС)

в) Проверьте используемую смесь полимераз на заведомо рабочих праймерах и матрице размером 1-10 т.п.н.

2. ПЦР-продукты получаются только с контрольной библиотеки. ПЦР с библиотекой, изготовленной из контрольной геномной ДНК, не проходит. ПЦР на экспериментальных библиотеках тоже не проходит.

а) Проверьте этап лигирования. Повторите его в случае необходимости.

б) Проверьте этап рестрикции и очистки. Концентрация ДНК до и после хлороформной экстракции должна быть приблизительно одинаковой. Проверьте это с помощью электрофореза. Если концентрация после очистки упала вдвое или сильнее. ДНК надо сконцентрировать. Это можно сделать путем высушивания ДНК в вакуумном ротационном испарителе лучше это сделать с помощью переосаждения с последующим растворением в меньшем объеме.

3. ПЦР-продукт нарабатывается с контрольных библиотек обоих типов (самодельной и поставляемой с набором), с экспериментальных библиотек ПЦР продукт не получается.

а) Попробуйте уменьшить температуру отжига/элонгации до 65°C или ниже.

б) Проверьте качество подбора ваших праймеров. Если реакция с контрольными (LVr) праймерами идет и дает нужный фрагмент, а ваши геноспецифичные праймеры - не дают продукта ни с какой из библиотек, Вам возможно следует подобрать праймеры заново. Если праймеры подбирались на основании последовательности кДНК, один из праймеров (первичный или вложенный) может находиться на в интрон-экзонной границе. В этом случае один или оба праймера надо подобрать заново. Не забывайте, что праймеры должны иметь температуру отжига не менее 68°C.

Если вы уверены, что праймеры не отжигаются на интрон-экзонную границу, следует проверить последовательность праймеров. В некоторых случаях причиной отсутствия продукта могут являться ошибки в последовательности праймера при подборе или при синтезе.

в) Целевая последовательность может быть GC-богатой. ПЦР на таких матрицах идет плохо. Повторите эксперимент, добавив в ПЦР и первого, и второго раунда ДМСО (финальная концентрация 5%). Для этого нужно заменить на ДМСО часть воды (2,5мкл ДМСО, 35,3мкл деионизованной воды). ДМСО следует добавлять в последнюю очередь. Важно: при использовании ДМСО следует использовать большее количество циклов (36 вместо 32 в ПЦР первого раунда, 24 цикла в ПЦР второго раунда).

Если это не поможет, попробуйте использовать в ПЦР первого и второго раунда 5% ДМСО и 3% глицерин. Если эффект не будет достигнут и после этого, попробуйте ввести в ПЦР этап пятисекундного нагрева до 99°C перед первым циклом.

4. ПЦР с геноспецифичными праймерами дает неспецифические продукты.

В общем, программа ПЦР со ступенчатым снижением температуры, которая применена в наборе, существенно повышает специфичность реакции и улучшает результат. Однако, если проблема всё-таки возникла, могут помочь следующие решения:

а) Если возможно, заново подберите геноспецифичные праймеры так, чтобы их температура отжига была более 68°C. Для этого подбирайте праймеры 26-30 н. длиной с содержанием GC-пар в районе 40-60%. Не делайте праймеров короче 26 н.

б) Если переделать праймеры невозможно, попробуйте изменить программу. Для ПЦР первого раунда, начните с температуры отжига/элонгации в 72°C и снижайте её на один градус каждые 2 цикла до 67°C. Оставшиеся 32 цикла следует провести с температурой отжига/элонгации 67°C. ПЦР второго раунда проводить по тому же принципу, только количество циклов при температуре отжига/элонгации 67°C следует сократить до 20.

В) Проблема может заключаться в неполном прохождении этапа рестрикции. В норме, если рестрикция прошла полностью. После ПЦР второго раунда получается одиночный бэнд. Однако бэнды могут быть множественными в случае организмов определенных видов (полиплоидные виды, некоторые растения) или при работе с генами из полигенных семейств.

## **VII. Рекомендации по идентификации ПЦР-продуктов, полученных с использованием набора.**

### **А. Рестрикционное картирование ПЦР-продуктов.**

Полученные продукты достаточно чисты для использования в рестрикционном картировании без клонирования.

### **Б. Клонирование ПЦР-продуктов.**

#### **1. Клонирование ПЦР-продуктов.**

Необходимость клонирования ПЦР продукта второго раунда может наступить по разным причинам.

- В случае низкого качества прямого секвенирования ПЦР продукта или наличия нецелевых продуктов или шмера при анализе на геле.
- Клонирование для изучения экспрессии или промоторной активности изучаемой последовательности.

Так или иначе, сделать это можно при помощи клонирования по рестрикционным сайтам, по тупым концам в вектор, подобный pJET 1.2 фирмы Fermentas, обеспечивающий селективное выживание бактерий несущих вектор с лигированной в него вставкой или с помощью ГА-клонирования по липким А-концам, создаваемым Taq-полимеразой. Если в ПЦР второго раунда получен одиночный бэнд высокой концентрации, без минорных полос и шмера, продукт можно клонировать напрямую. При наличии неспецифических продуктов реакции ПЦР-продукты следует очистить при помощи выделения из геля.

Обратите внимание, что для очистки выделением из геля рекомендуется использовать в качестве электрофорезного буфера TAE, а не TBE, потому что согласно нашему опыту, фрагменты ДНК, выделенные из TBE-гелей, клонировать сложнее.

Также обратите внимание, что необходимо минимизировать время облучения геля ультрафиолетом, так как это приводит к повреждению ДНК.

#### **2. Тестирование промоторной активности.**

ПЦР-продукты могут быть клонированы в вектор с репортерным геном. Клонирование в обеих ориентациях дает положительный и отрицательный контроль.

Обратите внимание на ATG-кодон! Если ваш геноспецифичный промотор отжигается выше целевого гена, следует удалить соответствующий старт-кодон из вектора. Это предотвратит возможные ложноотрицательные результаты, вызванные транскрипцией конструкций с двумя старт-кодонами.

#### **3. Объяснение результатов тестирования промоторной активности.**

Некоторые ПЦР-продукты, предположительно содержащие промоторную последовательность, заклонированные в обеих ориентациях, не обладают промоторной активностью. Возможны разные причины:

##### **А) Фрагмент на самом деле не содержит промотора**

Геноспецифичный праймер может располагаться в нескольких т.п.н. от промотора и быть отделенным от него рестрикционными сайтами для использованных в наборе рестриктаз. Не исключено, что праймер попадает не в первый экзон, и расстояние от него до промотора может превышать емкость набора (6 т.п.н.)

Выходом в данной ситуации может стать секвенирование ПЦР-продуктов, подбор праймеров к их концу и повторение эксперимента с новыми праймерами.

**Б) ПЦР-продукты содержат последовательность промотора, но репортерный ген не экспрессируется.**

Существует несколько причин для подобного поведения.

##### **1) Фрагмент заклонирован в неправильной ориентации, в этом случае следует**

испытать конструкцию с обратной ориентацией.

2) Промотор слишком слабый для обнаружения его экспрессии в составе использованной конструкции. В этом случае можно добавить в конструкцию энхансерные последовательности или заклонировать продукт в вектор, уже содержащий энхансеры.

3) Промотор индуцибелен, но условия его активации неизвестны. Здесь тоже может помочь клонирование в вектор с мощным энхансером. Кроме того, если промотор тканеспецифичным, ценные сведения могут быть получены при трансформации целого организма.

4) С конструкции считывается мРНК с двумя стар-кодонами. Это происходит в случае, если клонированный ПЦР-продукт кроме промотора содержал также начало первого экзона. Транскрипция такого гена приводит к конкуренции между двумя открытыми рамками считывания, при этом падает эффективность трансляции дистальной (репортерной) рамки падает. Если вы заподозрили возможность подобного варианта, проверьте экспрессию на уровне транскрипции измерением концентрации мРНК с помощью ПЦР-РВ.

5) Клонированный фрагмент помимо промоторной последовательности содержит негативный регулятор транскрипции. Известны т.н. «негативные энхансеры», предотвращающие экспрессию функционального промотора. В этом случае опять же может помочь клонирование в вектор с мощным энхансером, или тестирование субклонов, среди которых могут попадаться клоны, у которых эти последовательности делетированы.

#### 5) Делеционный анализ промотора

После обнаружения фрагментов с промоторной активностью может быть выполнен делеционный анализ с целью определения минимального промотора. Система совместима с любыми стандартными методами вложенных делеций.

#### В) Другие возможные способы применения набора.

-Изучение интрон-экзонных границ

-Изучение последовательностей, сцепленных с маркерами типа EST, STS, STR и т.п.

## Приложение

### Структура адаптера

Структура адаптера включает в себя три особенности, которые являются ключевыми.

1) Длинный одноцепочечный участок на 5'-конце, который содержит последовательность, комплементарную сайту посадки адаптерный праймеров. Таким образом, сайт для посадки праймера в адаптере изначально не содержится, он создается только в результате элонгации геноспецифичного праймера, что предотвращает паразитную амплификацию нецелевых фрагментов и образующихся на этапе лигирования димеров адаптеров.

2) Дальний от сайта лигирования 3'-конец адаптера заблокирован аминокислотной группой, что предотвращает достройку выступающего 5'-конца. Возможность отщепления защитной группы вместе с последним нуклеотидом за счет 3'-5'-экзонуклеазной активности точных полимераз также заблокирована за счет того, что последний нуклеотид пришит с использованием тиофосфатной связи.

3) Адаптер длиннее, чем праймеры к нему (эффект супрессии ПЦР). Эффект подавляет амплификацию нецелевых фрагментов и димеров адаптеров, у которых несмотря на принятые меры произошла достройка 3'-конца с образованием сайта связывания адаптерного праймера.

Всё это, вместе с комбинацией вложенной ПЦР и ступенчатым снижением температуры отжига/элонгации приводит к возможности специфической амплификации мишени из очень сложной смеси фрагментов, из которых каждый содержит адаптерную последовательность.

Эффект подавления ПЦР.

4) В редких случаях, несмотря на принятые меры, происходит достройка 3'-конца с образованием сайта связывания адаптерного праймера. Это приводит к тому, что на следующем цикле возникает молекула, фланкированная полноразмерными сайтами для посадки адаптерных праймеров на обоих концах. Такая молекула может амплифицироваться с адаптерных праймеров вне зависимости от наличия на ней сайта для посадки геноспецифичного праймера. В отсутствие эффекта подавления ПЦР это приводило бы к неконтролируемой наработке неспецифических продуктов. Однако, адаптерные праймеры сильно короче самого адаптера, за счет чего взаимодействие достроенных адаптерных последовательностей с короткими праймерами идет гораздо менее эффективно, чем слипание взаимокomплементарных длинных концов. Эффект ослабляется или может пропасть при использовании температуры отжига/элонгации менее 65°C или при длине фрагмента более 6 т.п.н.