



КРАТКАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

GenSeq

Набор реагентов для секвенирования ДНК по методу Сенгера





Используемые пиктограммы

Знак	Описание
	Производитель
	Каталожный номер
	Срок годности
	Номер лота
	Температурный режим хранения
	Минимальное количество реакций
	Ссылка на информацию, размещённую на сайте производителя

Информация о продукте

Набор реагентов для секвенирования ДНК по методу Сенгера



GenSeq-24



GenSeq-100



GenSeq-1000

Информация о производителе



125499, Москва, Кронштадтский б-р, 39 к1

e-mail: syntol@syntol.ru



www.syntol.ru



Описание набора

Набор реагентов «GenSeq» содержит все необходимые компоненты для постановки реакции секвенирования методом терминации синтеза цепи ДНК по Сенгеру в формате готовой реакционной смеси (2.5x ГРС). Для проведения реакции пользователю необходимо смешать готовую реакционную смесь, содержащую 2,5-кратный буфер (2.5x ГРС) с рассчитанным количеством исследуемой ДНК-матрицы, праймером для секвенирования, довести 5-кратным буфером для разведения реакции и водой до нужного объема реакции.

Набор реагентов «GenSeq» разработан для получения флуоресцентно-меченых продуктов циклического секвенирования ПЦР-продуктов или плазмид с последующей обработкой на генетическом анализаторе методом капиллярного электрофореза. Набор позволяет получать данные, содержащие сбалансированные по высоте пики и хроматограммы высокого качества с длиной прочтения до 1000 нуклеотидов.

Состав набора

Кат. номер	Реакций	2.5x ГРС	5x буфер	Спектральный калибратор*	Плазмида pGEM-3Zf(+)	Праймер M13for(-21)	Формамид ДИ-ФА
GenSeq-24	24	192 мкл	1.5 мл	Сухой	20 мкл	20 мкл	0.5 мл
GenSeq-100	100	800 мкл	1.5 мл	Сухой	20 мкл	20 мкл	0.5 мл
GenSeq-1000	1000	10 x 800 мкл	10 x 1.5 мл	Сухой	10 x 20 мкл	10 x 20 мкл	10 x 0.5 мл

Рекомендуемые дополнительные компоненты

Название	Кат. номер	Компонент	Объем
dH ₂ O	NPH-W25	Деионизированная вода, свободная от нуклеаз и ДНК	25 мл
ДИ-ФА	DIFA-10	Деионизированный формамид для электрокинетической инъекции образцов (капиллярный электрофорез)	10 мл

Важно !!! Перед постановкой реакции секвенирования необходимо ознакомиться с рекомендациями, изложенными в этой инструкции.

* лиофилизат, для применения необходимо растворить калибратор в 250 мкл формамида ДИ-ФА



Общие рекомендации к использованию набора

- Избегайте множественных циклов оттаивания/замораживания 2.5х ГРС.
- После размораживания тщательно перемешивайте каждый компонент на вортексе в течение нескольких секунд.
- Не оставляйте размороженные компоненты на длительное время в тепле.
- Не оставляйте 2.5х ГРС на длительное время в освещенном месте, не подвергайте воздействию яркого света.

Безопасное использование компонентов набора

- Используйте средства индивидуальной защиты, такие как одноразовые перчатки, защитные очки и т.п.

Подготовка матричной ДНК из ПЦР-продукта

- Для достижения наилучшего результата секвенирования ПЦР-продукт необходимо очистить от компонентов реакции амплификации, прежде всего от не включившихся в реакцию праймеров, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а также компонентов ПЦР-буфера. Мы рекомендуем использовать обработку ампликона экзонуклеазой EhoI (*E. coli*) с последующей очисткой (обессоливанием) ПЦР-продукта с использованием набора на магнитных частицах «SynMag», Синтол.

Для обработки экзонуклеазой добавьте к ПЦР-продукту 0.5-1 мкл EhoI (*E. coli*), перемешайте пипетированием или на вортексе. Инкубируйте 15 минут при 37 °С, инактивируйте фермент 5 минут при 85 °С.

Рекомендуемое количество ДНК для постановки реакции секвенирования

Тип матричной ДНК	Количество	
ПЦР-продукт	100 - 200 п.н.	25-50 нг
	250 – 500 п.н.	50-100 нг
	600 – 900 п.н.	75-150 нг
	1000-2000 п.н.	100-200 нг
	>3000 п.н.	300 нг
Одноцепочечная ДНК	50-300 нг	
Двуцепочечная ДНК	150-500 нг	
Космида, ВАС	0.5-1мкг	
Бактериальная геномная ДНК	1 мкг	



Реакция секвенирования, приготовление реакционных смесей

Пример приготовления одной реакционной смеси в объеме 20 мкл:

Кратность	2,5X ГРС, мкл	5X Буфер, мкл	$_{dd}H_2O$, мкл	Праймер*, мкл	Матричная ДНК**, мкл
1X	8	–	10	1	1
2X	4	2	12	1	1
4X***	2	3	13	1	1
8X	1	3.5	13.5	1	1
16X	0.5	3.75	13.75	1	1

Пример приготовления одной реакционной смеси в объеме 8 мкл:

Кратность	2,5X ГРС, мкл	5X Буфер, мкл	$_{dd}H_2O$, мкл	Праймер*, мкл	Матричная ДНК**, мкл
1X	3.2	–	2.8	1	1
2X	1.6	0.8	3.6	1	1
4X***	0.8	1.2	4	1	1
8X	0.4	1.4	4.2	1	1
16X	0.2	1.5	4.3	1	1

Использование праймеров для секвенирования

При секвенировании ДНК используется только один праймер (в отличие от ПЦР, где используется пара праймеров). Для получения оптимального покрытия ставьте реакции секвенирования отдельно с прямым (forward) и обратным (reverse) праймерами с последующим анализом прямой и обратной комплементарной последовательности.

При постановке реакции секвенирования ДНК рекомендовано использовать растворы праймеров с концентрацией 2.5 – 4 пмоль/мкл. При добавлении праймеров и ДНК в реакционную смесь необходимо учитывать, что конечный объем реакции не должен отклоняться от указанного в таблице. Если такое отклонение происходит, то его необходимо компенсировать изменением объема вносимой $_{dd}H_2O$.

*/** Объемы вносимых праймера и раствора матричной ДНК приведены как рекомендованные при постановке реакции секвенирования с использованием контрольной ДНК pGEM-3Zf(+) и праймера M13for(-21), входящих в комплект набора. Такую постановку реакции следует использовать для проверки качества работы набора.

*** Рекомендованная кратность реакции. Оптимальное соотношение «Высота сигнала/стоимость реакции».



Циклическое секвенирование

Для осуществления реакции секвенирования ДНК рекомендовано использовать высококачественный пластик (стрипованный или в планшетах) с лунками объёмом 0.2 мл. Термоциклер должен иметь возможность подогрева крышки до 105-110 °С, скорость нагрева/охлаждения около 1 °С/сек, а также возможность термостатирования после окончания циклов при 4–12 °С.

Сразу после приготовления реакционных смесей следует установить реакционные пробирки в термоциклер и запустить программу:

№ шага	Стадия	Циклы	Температура	Время
1	Начальная денатурация	1	96 °С	2 минуты
	Денатурация		96 °С	10 сек
	Отжиг		52 °С	10 сек
2	Элонгация	35*	70 °С	2** минуты
	Хранение		4-12 °С	До выключения прибора

Очистка продукта реакции секвенирования

Перед анализом продуктов реакции секвенирования в генетическом анализаторе необходимо подготовить образец – удалить все не включившиеся в реакцию компоненты, а также обессолить. Для этого рекомендуется использовать набор для очистки продуктов реакции секвенирования «SeqMag», Синтол.

Поддержка пользователей

Для получения технической поддержки обращайтесь по email: syntol@syntol.ru

*/** С целью повышения эффективности прохождения реакции и улучшения качества результирующей хроматограммы в случае 8-кратного и 16-кратного разведения готовой реакционной смеси рекомендуется увеличить количество циклов в блоке 2 (денатурация/отжиг/элонгация) до 50 и/или увеличить время элонгации до 4 минут. Такой режим также рекомендуется при постановке реакции на ночь.

