Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору dsGreen® для кПЦР лиофилизированный

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору dsGreen® для кПЦР
лиофилизированный 3-6

RU

Инструкция к набору dsGreen® для кПЦР лиофилизированный

Набор для кПЦР dsGreen® лиофилизированный применяется для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и подходит для определения копийности и уровня экспрессии генов, а также генотипирования методом кПЦР. Для детекции в наборе используется интеркалирующий краситель dsGreen структурный .

Реакционная смесь в наборе не содержит референсный краситель ROX, что позволяет её использовать с real-time амплификаторами любого типа.

Полимераза с технологией «горячего старта», входящая в состав набора, предотвращает неспецифическую амплификацию ДНК. Объём смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объёмом 20 мкл.

Состав набора

Компонент набора	Количество 32162 100 реакций
31315, Лиофилизированная полимераза Taq с горячим стартом, 100 rxn	1
51215, Буфер для растворения полимеразы, 1 mL	1
11010, dsGreen® для ПЦР реального времени, 100×, 100 uL	1

Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре. Хранение: при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Совместимость с оборудованием: совместим с real-time амплификаторами любого типа.

Протокол

1. Растворите **лиофилизированную смесь** (Компонент #1) **буфером для ресуспендирования** (Компонент #2). Для этого добавьте весь объём **буфера для ресуспендирования** (Компонент #2) в пробирку с **лиофилизированной смесью** (Компонент #1). Тщательно перемешайте и дождитесь полного растворения фермента (~5 минут).
2. Добавьте в пробирку 20 мкл **dsGreen для ПЦР реального времени, 100x** (Компонент #3). Тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.

   Важно! *Храните реакционную смесь после растворения и добавления красителя dsGreen в морозильной камере (-20°C).*
3. Смешайте компоненты реакции согласно приведённой ниже таблице в указанной последовательности из расчёта на (N+0,1N) реакций, где N — необходимое число реакций. Готовую смесь перемешайте на вортексе и сбросьте капли центрифугированием.

   Важно! *Объём реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объём реакции менее 10 мкл не рекомендуется.*

   Расчет на 1 реакцию объёмом 20 мкл:
   При использовании другого объёма реакции следует пересчитать объёмы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций.

Компонент	Объём	Примечание
2x Реакционная смесь	10 мкл	—
Прямой праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 250–750 нМ)
Обратный праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объёма реакции 20 мкл	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.4)

Общий объём реакции 20 мкл

4. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объёма образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.

   Важно! *Для получения воспроизводимых результатов реакцию рекомендуется ставить в двух и более повторах для каждого образца ДНК.*

Программа амплификации

Для расчёта температуры плавления (Tm) праймеров рекомендуется использовать стандартные инструменты, работающие по алгоритму Nearest-Neighbor (SantaLucia J. Jr., 1998). Температура отжига праймеров рассчитывается по формуле Ta=Tm-5°C.

Если температура отжига праймеров ≥60°C:

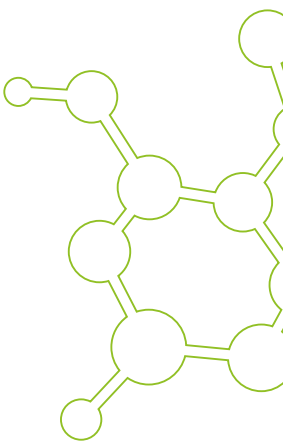
Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	40
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	60–72°C	30–60 сек	

Если температура отжига праймеров <60°C:

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	40
Отжиг праймеров (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	55–59°C	10–15 сек	
Элонгация	72°C	15–30 сек	

Важно! *После проведения амплификации, для того чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95°C.*

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com