



Инструкция к набору dsGreen для кПЦР  
лиофилизированный



## Contents

|  |     |
|--|-----|
| Русский: Инструкция к набору dsGreen для кПЦР<br>лиофилизированный ..... | 3-6 |
|--|-----|

# 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<br>32162<br>100 реакций |
|--|------------------------------------|
| 31315, Лиофилизированная полимеразы Taq с горячим стартом, 100 гкл | 1                                  |
| 51215, Буфер для растворения полимеразы, 1 mL                      | 1                                  |
| 11010, dsGreen для ПЦР реального времени, 100x, 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 ( $T_m$ ) праймеров рекомендуется использовать стандартные инструменты, работающие по алгоритму Nearest-Neighbor (SantaLucia J. Jr., 1998). Температура отжига праймеров рассчитывается по формуле  $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ .

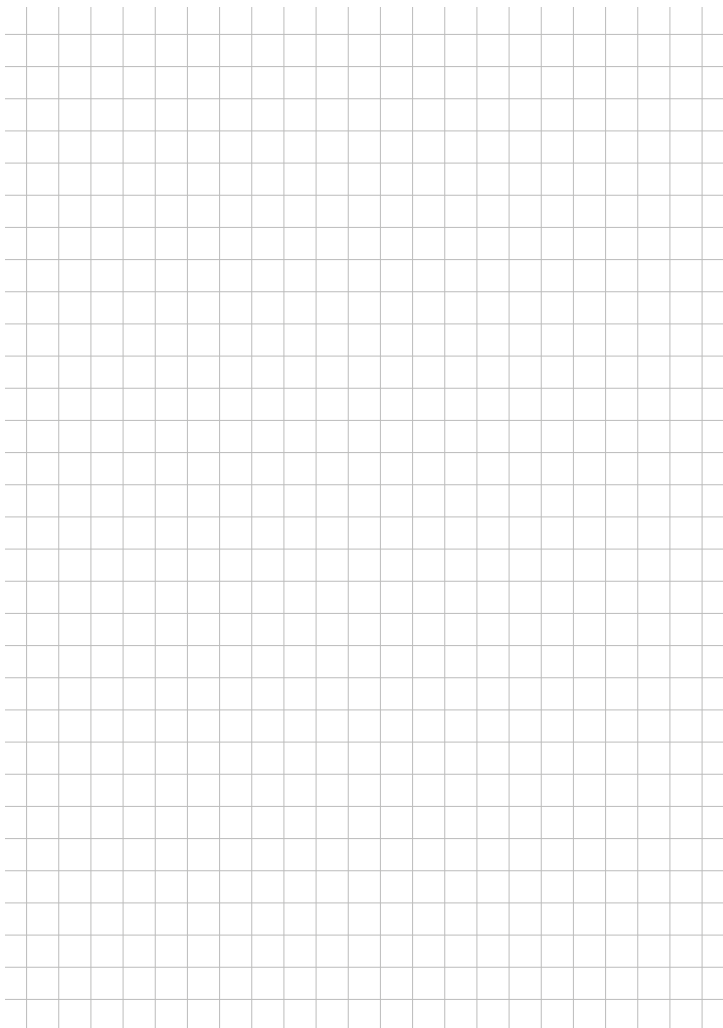
### Если температура отжига праймеров $\geq 60^\circ\text{C}$ :

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

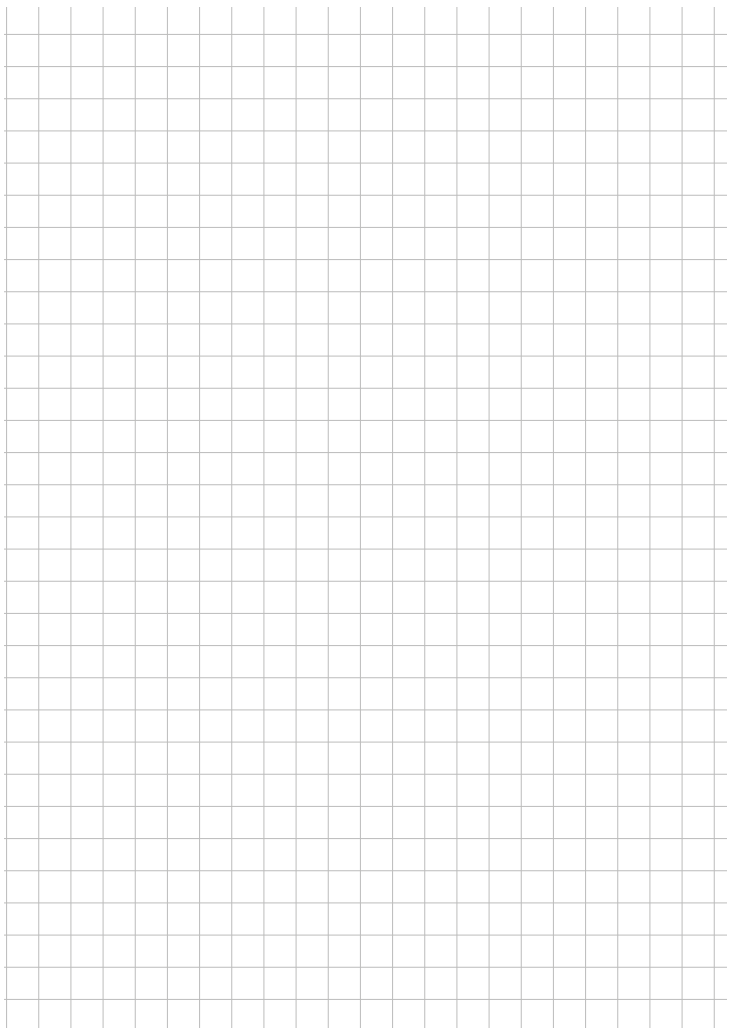
### Если температура отжига праймеров $< 60^\circ\text{C}$ :

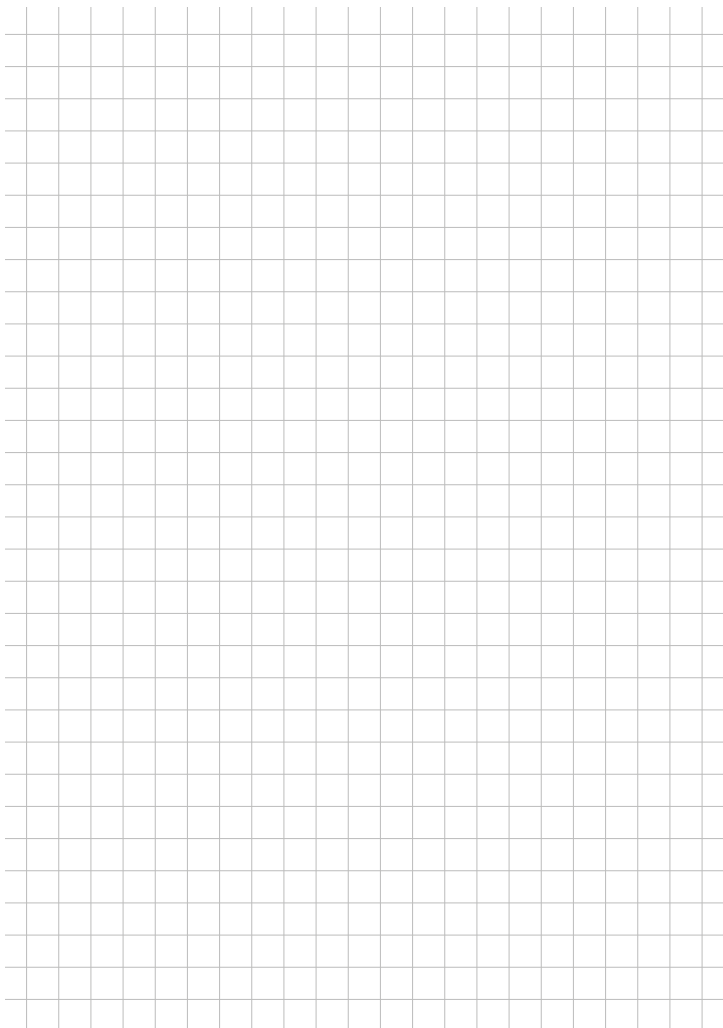
| Стадия  | Температура                   | Время     | Число циклов |
|---|-------------------------------|-----------|--------------|
| Активация HS Taq-полимеразы   | $95^\circ\text{C}$            | 5 мин     | 1            |
| Денатурация   | $95^\circ\text{C}$            | 10 сек    | 40       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

**Важно!** После проведения амплификации, для того чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от  $60$  до  $95^\circ\text{C}$ .













22.09.509-QM  
Issued by INSPECT



[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)

