



Инструкция к набору Eva488 для кПЦР
лиофилизированный

Contents

Русский: Инструкция к набору Eva488 для кПЦР лиофилизированный	3-6
---	-----

Инструкция к набору Eva488 для кПЦР лиофилизированный

Набор для кПЦР Eva488 лиофилизированный применяется для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и подходит для определения копийности и уровня экспрессии генов, а также генотипирования методом кПЦР. Полимераза с технологией «горячего старта» предотвращает неспецифическую амплификацию. Для детекции в наборе используется интеркалирующий краситель Eva488 (полный аналог EvaGreen®) — связывающийся с ДНК краситель, не ингибирующий реакцию и характеризующийся ярким разгоранием.

Реакционная смесь в наборе не содержит референсный краситель ROX и поэтому совместима с real-time амплификаторами любого типа. Объем смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объемом 20 мкл.

Состав набора

Компонент набора	Количество
	33162
	100 реакций
31315, Лфофилизированная полимераза Taq с горячим стартом, 100 гхп	1
52215, Буфер для растворения полимеразы с Eva488, 1 mL	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 на вортексе и дождитесь полного растворения фермента (~5 минут).

Важно! *Храните реакционную смесь после растворения в морозильной камере (-20°C).*

2. 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 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.3)
Общий объём реакции	20 мкл	

3. 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°C	5 мин	1
Денатурация	95°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°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	40
Отжиг праймеров (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	$55\text{--}59^\circ\text{C}$	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

