

Реакционная смесь для кПЦР ProbeMaster® ROX, 5x

Реакционная смесь для кПЦР ProbeMaster ROX, 5x подходит для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе за счет присутствия нормирующего красителя ROX. Готовая 5-кратная реакционная смесь содержит необходимые компоненты для проведения ПЦР, ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации. Полимераза с технологией «горячего старта» предотвращает неспецифическую амплификацию. В случае постановки реакции кПЦР, для детекции флуоресценции следует использовать ДНК-зонд, меченный флуорофором и тушителем (гидролизуемые зонды, «молекулярные маяки», праймеры типа «скорпион») или два зонда, меченных флуорофорами, образующими FRET-пару (вы можете заказать [синтез зондов в Lumiprobe](#)). Помимо ДНК-зондов, для детекции флуоресценции может использоваться интеркалирующий краситель [dsGreen](#) (dsGreen). Нормировка сигнала осуществляется с помощью входящего в состав смеси референсного красителя ROX. Концентрация ROX была специально оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке. В состав данной смеси не входит Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG). При необходимости Вы можете заказать аналогичную [смесь с UDG](#).

Объем смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций объемом 25 мкл.

Состав реакционной смеси: HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+}), референсный краситель ROX.

Совместимость с оборудованием: совместим с амплификаторами любого типа.

Возможные приложения: качественная и количественная ПЦР, в том числе после обратной транскрипции, генотипирование и детекция SNP методом ПЦР, с детекцией как методом гель-электрофореза, так и в режиме реального времени с помощью флуоресцентных зондов или интеркалирующего красителя.

Протокол

1. Разморозьте реакционную смесь, тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.
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.

! Объем реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объем реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

Расчет на 1 реакцию объемом 25 мкл с детекцией в режиме реального времени:

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для кПЦР ProbeMaster ROX, 5x	5 мкл	
Прямой праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 200–600 нМ)
Обратный праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	
Зонд — или —	0.25–0.75 мкл 10 мкМ раствора	2.5–7.5 пмоль/реакцию (конечная концентрация 100–300 нМ)
Интеркалирующий краситель	Согласно рекомендации производителя	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 25 мкл	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 30–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.3)
Общий объем реакции	25 мкл*	

** при использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций*

3. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, закройте крышки пробирок, стрипов или заклейте планшет плёнкой, сбросьте капли центрифугированием.

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 $T_a = T_m - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$.

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

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)	60–72 °C	30–60 сек	

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

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)	55–59 °C	10–15 сек	
Элонгация	72 °C	15–30 сек	

! В случае использования интеркалирующего красителя, после проведения амплификации, для того чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95 °C.

1. Для анализа результатов ПЦР методом гель-электрофореза: смешайте образцы с буфером для нанесения на гель и внесите их в лунки геля, проведите электрофорез.

! При необходимости хранить продукты амплификации при -20 °C.

Хранение: -20 °C.

Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.