

## Амплификация ДНК с лиофилизированными шариками для кПЦР

Лиофилизированные шарик для кПЦР (x1534) — предварительно приготовленная и расфасованная форма реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Каждый лиофилизированный шарик для кПЦР представляет собой сухую гранулу, содержащую все необходимые компоненты для проведения ПЦР объемом 25 мкл.

Состав содержит высокопроцессивную Taq-полимеразу с горячим стартом. Шарик обеспечивают большую воспроизводимость между реакциями за счет минимизации этапов пипетирования, снижения вероятности ошибок при пипетировании, а также контаминации образцов. Каждая партия шариков для ПЦР проходит функциональное тестирование для обеспечения воспроизводимости от партии к партии.

Шарик подходит для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, в том числе для количественного анализа ([с флуоресцентными зондами](#) или интеркалирующим красителем, например, [Eva488](#)); а также для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Шарик также подходит для рутинных задач по клонированию и других применений, требующих дальнейшей работы с продуктом ПЦР после амплификации.

Лиофилизированный формат позволяет хранить готовую ПЦР-смесь до 12 месяцев при температуре до +4°C.

### Состав реакционной смеси:

- Taq-полимераза с горячим стартом;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP);
- оптимизированный буфер для ПЦР (содержит  $Mg^{2+}$  с концентрацией 3 мМ в 1x реакционной смеси);
- протекторы для лиофилизации.

### Совместимость с оборудованием:

Лиофилизированные шарик для кПЦР совместимы с амплификаторами любого типа и могут быть использованы как для постановки ПЦР в амплификаторах с классическими термоблоками для ПЦР-пробирок, так и в амплификаторах с картриджами.

### Возможные приложения:

Качественная и количественная ПЦР с детекцией в режиме реального времени, амплификация с последующим гель-электрофорезом, ПЦР после предварительной обратной транскрипции, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования, секвенирования и др.

## Протокол

*! Объем реакции может варьировать в зависимости от конкретной задачи, однако всегда должен быть кратным 25 мкл.*

1. Предварительно смешайте в отдельной пробирке компоненты реакции, кроме ДНК, согласно приведенной ниже таблице, из расчёта на  $(N + 0,1N)$  реакций, где  $N$  — необходимое число реакций.

• **Расчет на одну реакцию объемом 25 мкл с детекцией в режиме реального времени:**

| Компонент                            | Объем   | Примечание  |
|--------------------------------------|---|---|
| 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                                 | 0,25–0,75 мкл 10 мкМ раствора                         | 2.5–7.5 пмоль/реакцию (конечная концентрация 100–300 нМ)  |
| или Интеркалирующий краситель        | Согласно рекомендации производителя                   |   |
| ДНК                                  | 2–9 мкл   | Добавляется в п.4 отдельно в каждую пробирку.   |
| Деионизованная вода                  | Добавляется до общего объема реакционной смеси 24 мкл | С учетом объема образца ДНК, который будет добавлен в п.4.  |
| <b>Общий объём реакционной смеси</b> | <b>24 мкл</b>   | При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций |

• **Расчет на одну реакцию объемом 25 мкл с детекцией методом гель-электрофореза:**

| Компонент                            | Объем   | Примечание  |
|--------------------------------------|---|---|
| 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                           |   |
| ДНК                                  | 2–9 мкл   | Добавляется в п.4 отдельно в каждую пробирку.   |
| Деионизованная вода                  | Добавляется до общего объема реакционной смеси 24 мкл | С учетом объема образца ДНК, который будет добавлен в п.4.  |
| <b>Общий объём реакционной смеси</b> | <b>24 мкл</b>   | При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций |

2. Чистый пинцет протрите 70% раствором этанола и высушите. Пинцетом поместите по одному шарик в каждую пробирку для ПЦР.
3. Добавьте к шарикам приготовленную реакционную смесь.
4. Внесите в каждую пробирку отдельным наконечником пипетки 2–9 мкл образца ДНК/кДНК (суммарно 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК). После добавления ДНК суммарный объем реакции должен составить 25 мкл (шарик вносит 1 мкл в объем реакции), сбросьте капли центрифугированием.
5. Проведите амплификацию ДНК с использованием приведенных программ (температура отжига праймеров рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров).

• **Если температура отжига праймеров  $\geq 60$  °C**

| Стадия   | Температура | Время  | Число циклов |
|--|-------------|--------|--------------|
| Активация HS Taq-полимеразы  | 95 °C       | 5 мин  | 1            |
| Денатурация  | 95 °C       | 10 сек | 40–50        |
| Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией<br>(На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции) | 60–72 °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    | 40–50        |
| Отжиг праймеров<br>(На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции) | 55–59 °C    | 10–15 сек |              |
| Элонгация  | 72 °C       | 15–30 сек |              |

6. В случае использования интеркалирующего красителя для того, чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95°C после проведения амплификации.
7. Для анализа результатов ПЦР методом гель-электрофореза: смешайте образцы с буфером для нанесения на гель и внесите их в лунки геля, проведите электрофорез.
8. При необходимости продукты амплификации можно хранить при -20°C.