

Амплификация ДНК с реакционной смесью для ПЦР/кПЦР ProbeMaster® Eva488, 5×

ProbeMaster® Eva488 — готовая 5-кратная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения полимеразной цепной реакции и интеркалирующий краситель Eva488. Состав смеси оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации.

Реакционная смесь ProbeMaster® Eva488 подходит как для проведения ПЦР в режиме реального времени с помощью интеркалирующего красителя Eva488, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Из-за отсутствия в составе UDG/dUTP реакционная смесь может использоваться для рутинных задач по клонированию и других задач, требующих дальнейшего использования продукта ПЦР после амплификации.

Состав реакционной смеси

- HS Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+});
- интеркалирующий краситель Eva488.

Ключевые характеристики

- Объём 5-кратной смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций по 25 мкл.
- Смесь полностью готова к работе. Для постановки реакции в смесь необходимо добавить только образец ДНК, праймеры и воду, что значительно экономит время на постановку реакции. Формат готовой реакционной смеси снижает риск контаминации образцов.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК и др.
- Содержит высокопроцессивную Hot-Start Taq-полимеразу с активацией 5 мин при 95°C. Используемая HS Taq ДНК-полимераза представляет собой комплекс моноклональных антител с ферментом. Прогрев образца в первом цикле ПЦР приводит к инактивации антител в составе комплекса и активирует фермент. Технология «горячего старта» позволяет предотвратить неспецифическую амплификацию и образование димеров праймеров.
- HS Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной активностью; также обладает трансферазной активностью: присоединяет дополнительный адениновый остаток к 3' концам двуцепочечной ДНК, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Смесь содержит интеркалирующий краситель Eva488. Eva488 — димерный акридин, флуоресцирующий при связывании с двуцепочечной ДНК, характеризующийся ярким разгоранием и не ингибирующий реакцию. Eva488 является полным структурным аналогом красителя EvaGreen®.
- Не содержит UDG и dUTP.

Возможные приложения

ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с детекцией методом электрофореза, ПЦР с образцами кДНК после обратной транскрипции, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования и др.

Совместимость с оборудованием

Совместима с амплификаторами любого типа.

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.

! Для получения воспроизводимых результатов ПЦР рекомендуется ставить реакции в двух и более повторах для каждого образца ДНК.

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

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для ПЦР, 5x	5 мкл	
Прямой праймер	0,5–1,0 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 200–400 нМ
Обратный праймер	0,5–1,0 мкл 10 мкМ раствора	
Зонд или	0,25–0,75 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 100–300 нМ
Интеркалирующий краситель	Согласно рекомендации производителя	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакционной смеси 25 мкл*	С учетом объема образца ДНК, который будет добавлен в п.4
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку в п.4
Общий объем реакции	25 мкл*	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

• **Расчет на 1 реакцию ПЦР объемом 25 мкл* с детекцией методом гель-электрофореза:**

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для ПЦР, 5x	5 мкл	
Прямой праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 200–600 нМ
Обратный праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 25 мкл*	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку в п.4
Общий объем реакции	25 мкл*	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

*Объем реакции можно менять в зависимости от конкретной задачи, однако объем реакции менее 10 мкл не рекомендуется к работе.

3. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
4. Внесите в каждую пробирку отдельным наконечником пипетки 2–9 мкл образца ДНК/кДНК (кДНК, 30–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК). После добавления ДНК суммарный объем реакции должен составить 25 мкл. Закройте крышки пробирок, сбросьте капли центрифугированием.
5. Проведите амплификацию ДНК с использованием приведенных программ (температура отжига праймеров рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров).

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

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 с	40–50
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (на этом этапе должна производиться детекция флуоресценции**)	60–72°C	30–60 с	

• Если температура отжига праймеров < 60°C

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 с	40–50
Отжиг праймеров (на этом этапе должна производиться детекция флуоресценции**)	55–59°C	10–15 с	
Элонгация	72°C	15–30 с	

**Для детекции флуоресценции интеркалирующего красителя необходимо включить съёмку по каналу FAM.

- 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.
- 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 продукты амплификации можно хранить при -20°C.

Условия хранения

- Транспортировка/Хранение: при температуре не выше -20°C — 12 месяцев в пределах срока годности. При температуре от 0 до +25°C — 5 дней в пределах срока годности.
- Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.