

Амплификация ДНК с реакционной смесью для ПЦР/кПЦР ProbeMaster® Lyo UNI, 5x

ProbeMaster® Lyo UNI — готовая лиофилизированная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Лиофилизированный формат позволяет транспортировать продукт при комнатной температуре до трех недель. Для восстановления смеси в жидкую форму достаточно добавить указанное в инструкции количество воды.

Смесь ProbeMaster® Lyo UNI подходит как для проведения ПЦР в реальном времени, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Из-за отсутствия в составе UDG/dUTP данная 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 Mg²⁺)
- протекторы для лиофилизации

Ключевые характеристики смеси

- Одна пробирка лиофилизированной смеси после разведения в 450 мкл воды рассчитана на проведение 100 реакций объемом 25 мкл.
- Смесь полностью готова к применению, что снижает риск контаминации образцов и значительно экономит время на постановку реакции. Для постановки стандартной ПЦР (с последующим анализом методом гель-электрофореза) в смесь необходимо добавить только образец ДНК, праймеры и воду. Для постановки количественной ПЦР в смесь необходимо добавить интеркалирующий краситель или зонд для детекции продукта амплификации, образец ДНК, праймеры и воду.
- Для детекции флуоресценции следует использовать ДНК-зонд, меченный флуорофором и тушителем (гидролизуемые зонды, «молекулярные маяки», праймеры типа «скорпион») или два зонда, меченых флуорофорами, образующими FRET-пару (вы можете заказать [синтез зондов в Lumiprobe](#)). Помимо ДНК-зондов, для детекции флуоресценции может использоваться интеркалирующий краситель [dsGreen](#).
- Подходит для ПЦР фрагментов длиной до 3 тыс. п.о., не более 70% GC, не требующих высокоточной амплификации.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК и др.
- В состав реакционной смеси входит Таq-полимераза с технологией «горячего старта». Используемая HS Taq ДНК-полимераза представляет собой комплекс моноклональных антител с ферментом. Прогрев образца в первом цикле

Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Fedor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinxin Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

ПЦР приводит к инактивации антител в составе комплекса и активирует фермент. Технология «горячего старта» позволяет предотвратить неспецифическую амплификацию и образование димеров праймеров.

- Входящая в состав HS Таq ДНК-полимераза обладает 5'-3' полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной, аденилтрансферазной активностью, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Не содержит UDG и dUTP.

Возможные приложения

Количественная ПЦР (ПЦР-РВ) с применением интеркалирующих красителей типа dsGreen или гидролизуемых зондов, стандартная ПЦР (с последующим анализом методом гель-электрофореза), ПЦР после предшествующего синтеза кДНК, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования и др.

Совместимость с оборудованием

Совместим с амплификаторами любого типа

Протокол

1. Перед началом работы добавьте в лиофилизированную смесь 450 мкл дейонизированной воды, подождите 1 минуту, перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.
2. В дальнейшем восстановленную смесь можно хранить при +4°C в течение 30 дней или заморозить и хранить при -20°C в пределах срока годности. Допускается до 5 раз замораживать/размораживать смесь после восстановления из лиофилизированной формы.
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 и сбросьте капли центрифугированием.

! Для получения воспроизводимых результатов кПЦР рекомендуется ставить реакции в 2 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 | |
| Обратный праймер | 0,5–1,0 мкл 10 мкМ раствора | Конечная концентрация 200–400 нМ |
| 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 | |
| Обратный праймер | 0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора | Конечная концентрация 200–600 нМ |
| 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 проводить реакцию в объеме менее 10 мкл не рекомендуется.

4. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
5. 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.
6. 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 Таq-полимеразы | 95°C | 5 мин | 1 |
| Денатурация | 95°C | 10 с | |
| Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (на этом этапе должна производиться детекция флуоресценции) | 60–72°C | 30–60 с | 40–50 |

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

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

6. 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.
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.

Условия хранения

- Транспортировка: При температуре до +25°C — до 21 дня.
- Хранение: при температуре не выше +4°C — 12 месяцев в пределах срока годности.
- После восстановления в жидкую форму хранить при +4°C до 30 дней или заморозить и хранить при -20°C в пределах срока годности. Допускается не более 5 циклов замораживания/размораживания смеси после восстановления из лиофилизированной формы.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.