

## Амплификация ДНК с реакционной смесью для кПЦР ProbeMaster® Lyo ROX

ProbeMaster® Lyo ROX — лиофилизированная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения количественной ПЦР с применением интеркалирующих красителей или гидролизуемых зондов. Ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов с минимальным значением порогового цикла и высоким уровнем отношения сигнал/фон. Формат готовой реакционной смеси снижает риск контаминации образцов.

Реакционная смесь ProbeMaster® Lyo ROX позволяет решать большое количество задач с минимальными затратами времени. За счет присутствия референсного красителя ROX смесь подходит для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и может применяться для количественного анализа и определения экспрессии генов, генотипирования, детекции SNP и других приложений.

### Состав реакционной смеси:

- HS Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер (содержит  $Mg^{2+}$ );
- референсный краситель ROX;
- 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 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 также снижает риск контаминации образцов.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК, кДНК после обратной транскрипции и др.
- Содержит высокопроцессивную Hot-Start Taq-полимераза 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, присоединяя дополнительный адениновый остаток к 3' концам двуцепочечной ДНК, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Для нормировки сигнала в состав смеси входит референсный краситель ROX. Концентрация ROX специально

оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке.

- Смесь 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.

## Совместимость с оборудованием:

Совместим с амплификаторами любого типа.

### 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](mailto:order@lumiprobe.com)

### Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

### Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto: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](mailto:hk@lumiprobe.com)

### Lumiprobe LTD

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

### Lumiprobe Co., Ltd.

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

## Протокол

Перед началом работы добавьте в лиофилизированную смесь 450 мкл деионизированной воды, подождите 1 мин, перемешайте содержимое пробирки на вортексе и сбросьте капли центрифугированием. Восстановленную смесь можно хранить при +4°C в течении 30 суток или заморозить и хранить в пределах срока годности при -20°C. Допускается до 5 циклов замораживания/размораживания восстановленной смеси.

1. Тщательно перемешайте содержимое пробирки, 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	2,5–7,5 пмоль/реакцию (конечная концентрация 100–300 нМ)
Интеркалирующий краситель	Согласно рекомендации производителя	
Деионизированная 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
<b>Общий объём реакции</b>	<b>25 мкл*</b>	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 объём 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  $< 60^{\circ}\text{C}$**

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

\*\* В настройках прибора выбрать канал ROX для пассивного референса.

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

- 12 месяцев (с момента доставки) при температуре до +4°C. Транспортировка: до 21 суток при температуре до +25°C.
- После восстановления в жидкую форму – хранить при +4°C до 30 суток или при -20°C в пределах срока годности. Продукт в жидкой форме не теряет функциональных свойств после 5 циклов заморозки-разморозки.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.