

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

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

Feodor-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 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

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

Lumiprobe GmbH

Feodor-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 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: 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 |
| Общий объём 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 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.

- 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: 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 восстановленной смеси.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.