

Лабораторный протокол: qPCR с dsGreen

Флуоресцентный интеркалирующий краситель dsGreen обладает очень высокой чувствительностью к наличию двухцепочечной ДНК и используется для неспецифической детекции амплификации ДНК в ПЦР «в реальном времени» (количественной ПЦР).

1. Если dsGreen хранился при температуре ниже 20 °С необходимо заранее его разморозить и хранить при комнатной температуре в темноте. Для быстрого оттаивания краситель можно инкубировать при температурах до 50 °С.
2. Рассчитайте объемы реагентов, необходимых для постановки реакции согласно протоколу производителя реагентов для ПЦР. Помните, что краситель dsGreen (100x в стоковой концентрации) должен быть разведен в смеси для ПЦР до 1x концентрации.
3. Приготовьте 1x смесь для ПЦР без образцов ДНК согласно протоколу производителя реагентов для ПЦР, добавьте необходимое количество dsGreen. Если Вы используете Taq-полимеразу без горячего старта, держите смесь для ПЦР на льду.
4. Поместите необходимое количество смеси для ПЦР в пробирки для ПЦР, добавьте образцы ДНК.
5. Проведите полимеразную цепную реакцию согласно инструкции к Вашему амплификатору.

Замечания:

При проведении ПЦР-анализа всегда используйте положительный и отрицательный контроли. Программа амплификации для количественной ПЦР не отличается от программы для стандартной ПЦР для конкретных праймеров/матрицы. Для детекции используйте канал FAM (для Rotor-Gene — зеленый канал). Для того, чтобы иметь возможность отличать специфический продукт амплификации от димеров праймеров добавьте в программу амплификации этап со съемкой кривой плавления ампликона.

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
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