

Реакционная смесь для кПЦР ProbeMaster ROX+UDG, 2x

Смесь для кПЦР ProbeMaster подходит для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и может применяться для определения уровня копийности и экспрессии генов, генотипирования и детекции SNP, и др. методом кПЦР. Готовая 2-х кратная реакционная смесь содержит все необходимые компоненты для проведения количественной ПЦР, ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов с минимальным значением порогового цикла и высоким уровнем отношения сигнал/фон. Полимераза с технологией «горячего старта» предотвращает неспецифическую амплификацию, а урацил-ДНК-гликозилаза исключает кросс-контаминацию и получение ложноположительных результатов. Для детекции флуоресценции следует использовать ДНК-зонд, меченный флуорофором и тушителем (гидролизуемые зонды, «молекулярные маяки», праймеры типа «скорпион») или два зонда, меченных флуорофорами, образующими FRET-пару (вы можете заказать [синтез зондов в Lumiprobe](#)). Помимо ДНК-зондов, для детекции флуоресценции может использоваться интеркалирующий краситель [dsGreen](#) (dsGreen). Нормировка сигнала осуществляется с помощью входящего в состав смеси референсного красителя ROX. Концентрация ROX была специально оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке. Объем смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объемом 20 мкл.

Состав реакционной смеси: HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (включая dUTP), урацил-ДНК-гликозилаза (UDG), ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+}), референсный краситель ROX.

Совместимость с оборудованием: совместим с большинством real-time амплификаторов, в том числе производства Applied Biosystems (7300, 7500, 7500 Fast, 7900HT, QuantStudio 12k Flex, QuantStudio 3, QuantStudio 5, QuantStudio 6 Flex, QuantStudio 7, StepOne, StepOnePlus, ViiA 7 System), Bio-Rad (CFX384, CFX 96, iQ5), Roche (LC 480), Stratagene (MX3000P, MX3005P, MX4000) и др.

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

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 реакцию рекомендуется ставить в 2 и более повторах для каждого образца ДНК.

! Объем реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объем реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

Расчет на 1 реакцию объемом 20 мкл:

Компонент	Объем	Примечание
2x Реакционная смесь ProbeMaster	10 мкл	
Прямой праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 250–750 нМ)
Обратный праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	
Зонд — или —	0.25–0.75 мкл 10 мкМ раствора	2.5–7.5 пмоль/реакцию (конечная концентрация 125–375 нМ)
Интеркалирующий краситель	Согласно рекомендации производителя	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 20 мкл	
ДНК	2–8 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.3)
Общий объем реакции	20 мкл*	

** при использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций*

3. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.

Программа амплификации:

Для расчёта температуры плавления (T_m) праймеров рекомендуется использовать стандартные инструменты, работающие по алгоритму Nearest-Neighbor (SantaLucia J Jr., 1998). Температура отжига праймеров рассчитывается по формуле $T_a = T_m - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$.

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

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

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

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

! (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.