

Реакционная смесь для ПЦР/кПЦР, 2х

Смесь PCR/qPCR подходит как для проведения количественной ПЦР, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Готовая 2-х кратная реакционная смесь содержит необходимые компоненты для проведения ПЦР, ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации (содержит Hot-start полимеразу). В случае постановки реакции кПЦР, 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). Из-за отсутствия в составе UDG/dUTP смесь PCR/qPCR может использоваться для рутинных задач по клонированию и других задач, требующих дальнейшего использования продукта ПЦР после амплификации. Объем смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объемом 20 мкл.

Состав реакционной смеси: HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+}).

Совместимость с оборудованием: совместим с амплификаторами любого типа.

Возможные приложения: кПЦР, стандартная ПЦР, ОТ-ПЦР, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования 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 кПЦР рекомендуется ставить реакции 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 количественной ПЦР объемом 20 мкл:

Компонент	Объем	Примечание
2x Реакционная смесь PCR/qPCR	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	2–9 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*

- Расчет на 1 реакцию стандартной ПЦР объемом 20 мкл:

Компонент	Объем	Примечание
2x Реакционная смесь PCR/qPCR	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	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 20 мкл	

ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.3)
Общий объём 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 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 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.

4. (В случае стандартной ПЦР) 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 хранить продукты амплификации при -20 °C.

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