

## Амплификация ДНК с реакционной смесью для ПЦР/кПЦР ProbeMaster® Eva488 ROX, 5×

ProbeMaster® Eva488 ROX — готовая 5-кратная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения полимеразной цепной реакции, а также интеркалирующий краситель Eva488 и референсный краситель ROX. Состав смеси оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации.

Реакционная смесь ProbeMaster® Eva488 ROX подходит для проведения ПЦР в режиме реального времени с помощью интеркалирующего красителя Eva488, и позволяет точно определять содержание ДНК матрицы в пробе за счет присутствия нормирующего красителя ROX. Смесь может быть использована для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза.

### Состав реакционной смеси

- HS Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер (содержит  $Mg^{2+}$ );
- интеркалирующий краситель Eva488;
- референсный краситель ROX

### Ключевые характеристики смеси

- Объем 5-кратной смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций по 25 мкл.
- Смесь полностью готова к работе, что значительно экономит время на постановку реакции и снижает риск контаминации образцов.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК и др.
- Содержит высокопроцессивную Hot-Start Taq-полимеразу 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, что позволяет предотвратить неспецифическую амплификацию и образование димеров праймеров.
- HS Taq ДНК-полимераза обладает помимо 5'-3' полимеразной и 5'-3' экзонуклеазной активностей, также обладает трансферазной активностью, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Смесь содержит интеркалирующий краситель Eva488. Eva488 — димерный акридин, характеризующийся ярким разгоранием при связывании с двухцепочечной ДНК и не ингибирующий реакцию. Eva488 является полным аналогом красителя EvaGreen®.
- Для нормировки сигнала в состав смеси входит референсный краситель ROX. Концентрация ROX специально оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке.

## 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.

## 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 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	
Деионизованная 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 объем реакции</b>	<b>25 мкл*</b>	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

• **Расчет на 1 реакцию ПЦР объемом 25 мкл\* с детекцией методом гель-электрофореза:**

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для ПЦР, 5x	5 мкл	
Прямой праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 200–600 нМ
Обратный праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 25 мкл*	
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 объем 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.

- В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
- 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 объем реакции должен составить 25 мкл. Закройте крышки пробирок, сбросьте капли центрифугированием.
- 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°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	

\*\*Для детекции флуоресценции интеркалирующего красителя необходимо включить съёмку по каналу FAM. В настройках прибора выбрать канал ROX для пассивного референса.

- После проведения амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени, 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/Хранение: при температуре не выше -20°C — 12 месяцев в пределах срока годности. При температуре от 0 до +25°C — 5 дней в пределах срока годности.
- Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.