

## Амплификация ДНК с реакционной смесью для ПЦР/кПЦР ProbeMaster® Lyo UNI, 5x

ProbeMaster® Lyo UNI — готовая лиофилизированная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Лиофилизированный формат позволяет транспортировать продукт при комнатной температуре до трех недель. Для восстановления смеси в жидкую форму достаточно добавить указанное в инструкции количество воды.

Смесь ProbeMaster® Lyo UNI подходит как для проведения ПЦР в реальном времени, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Из-за отсутствия в составе UDG/dUTP данная смесь может использоваться для рутинных задач по клонированию и других задач, требующих дальнейшего использования продукта ПЦР после амплификации.

### Состав реакционной смеси

- HS Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер (содержит  $Mg^{2+}$ )
- протекторы для лиофилизации

### Ключевые характеристики смеси

- Одна пробирка лиофилизованной смеси после разведения в 450 мкл воды рассчитана на проведение 100 реакций объемом 25 мкл.
- Смесь полностью готова к применению, что снижает риск контаминации образцов и значительно экономит время на постановку реакции. Для постановки стандартной ПЦР (с последующим анализом методом гель-электрофореза) в смесь необходимо добавить только образец ДНК, праймеры и воду. Для постановки количественной ПЦР в смесь необходимо добавить интеркалирующий краситель или зонд для детекции продукта амплификации, образец ДНК, праймеры и воду.
- Для детекции флуоресценции следует использовать ДНК-зонд, меченный флуорофором и тушителем (гидролизующие 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](#).
- Подходит для ПЦР фрагментов длиной до 3 тыс. п.о., не более 70% GC, не требующих высокоточной амплификации.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК и др.
- В состав реакционной смеси входит Taq-полимераза с технологией «горячего старта». 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.

- Входящая в состав HS Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной, аденилтрансферазной активностью, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Не содержит UDG и dUTP.

## Возможные приложения

Количественная ПЦР (ПЦР-РВ) с применением интеркалирующих красителей типа dsGreen или гидролизуемых зондов, стандартная ПЦР (с последующим анализом методом гель-электрофореза), ПЦР после предшествующего синтеза кДНК, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования и др.

## Совместимость с оборудованием

Совместим с амплификаторами любого типа

## Протокол

1. Перед началом работы добавьте в лиофилизированную смесь 450 мкл деионизированной воды, подождите 1 минуту, перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием.
2. В дальнейшем восстановленную смесь можно хранить при +4°C в течении 30 дней или заморозить и хранить при -20°C в пределах срока годности. Допускается до 5 раз замораживать/размораживать смесь после восстановления из лиофилизированной формы.
3. Смешайте компоненты реакции согласно приведённой ниже таблице в указанной последовательности из расчёта на (N+O,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.*

• **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 <i>или</i>	0,25–0,75 мкл 10 мкМ раствора	Конечная концентрация 100–300 нМ
Интеркалирующий краситель	Согласно рекомендации производителя	
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 проводить реакцию в объеме менее 10 мкл не рекомендуется.

4. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
5. 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.
6. 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	

6. 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.
7. Для анализа результатов ПЦР методом гель-электрофореза: смешайте образцы с буфером для нанесения на гель и внесите их в лунки геля, проведите электрофорез.
8. При необходимости продукты амплификации можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 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 смеси после восстановления из лиофилизированной формы.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.

### **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](mailto:order@lumiprobe.com)

### **Lumiprobe GmbH**

Feodor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

### **Lumiprobe RUS Ltd**

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto:ru@lumiprobe.com)