

Реакционная смесь ProbeMaster® Lyo Eva488 ROX

ProbeMaster® Lyo Eva488 ROX — лиофилизованная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также интеркалирующий краситель Eva488 и референсный краситель ROX. Состав смеси оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации.

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

Реакционная смесь ProbeMaster® Lyo 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 также 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;
- 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 работе. Для постановки реакции в смесь необходимо добавить только образец ДНК, праймеры и воду, что значительно экономит время на постановку реакции. Формат готовой реакционной смеси снижает риск контаминации образцов.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК, кДНК после обратной транскрипции 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. Технология «горячего старта» позволяет предотвратить неспецифическую амплификацию и образование димеров праймеров.

- HS Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной активностью; также обладает трансферазной активностью: присоединяет дополнительный адениновый остаток к 3' концам двуцепочечной ДНК, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.
- Смесь содержит интеркалирующий краситель Eva488. Eva488 — димерный акридин, флуоресцирующий при связывании с двуцепочечной ДНК, характеризующийся ярким разгоранием и не ингибирующий реакцию. Eva488 является полным структурным аналогом красителя EvaGreen®. Флуоресценция красителя Eva488 детектируется по каналу FAM.
- Для нормировки сигнала в состав смеси входит референсный краситель ROX. Концентрация ROX была специально оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке.
- Не содержит UDG и dUTP.

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

Перед началом работы добавьте в лиофилизированную смесь 450 мкл деионизированной воды, подождите 1 минуту, перемешайте содержимое пробирки и сбросьте капли центрифугированием. В дальнейшем восстановленную смесь можно хранить при +4°C в течении 30 дней или заморозить и хранить в пределах срока годности при -20°C. Допускается до 5 раз замораживать/размораживать смесь после восстановления из лиофилизированной формы.

1. 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
Общий объём реакции	25 мкл*	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
Общий объём реакции	25 мкл*	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 объём реакции должен составить 25 мкл. Закройте крышки пробирок, сбросьте капли центрифугированием.

5. 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	

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

- 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.
- 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

- 12 месяцев (с момента доставки) при +4°C. Транспортировка: до 21 дня при температуре до +25°C.
- После восстановления в жидкую форму – хранить при +4°C до 30 дней или при -20°C в пределах срока годности. Продукт в жидкой форме не теряет функциональных свойств после 5 циклов заморозки-разморозки.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.