

Амплификация ДНК с реакционной смесью для кПЦР ProbeMaster® ROX, 5×

ProbeMaster® ROX — готовая 5-кратная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения количественной ПЦР с применением интеркалирующих красителей или гидролизуемых зондов. Ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов с минимальным значением порогового цикла и высоким уровнем отношения сигнал/фон. Формат готовой реакционной смеси снижает риск контаминации образцов.

ProbeMaster® ROX позволяет решать большое количество задач с минимальными затратами времени. Смесь подходит для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и может применяться для определения уровня копийности и экспрессии генов, генотипирования, детекции SNP и других приложений.

Состав реакционной смеси

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

Ключевые характеристики смеси

- Смесь полностью готова к применению. Для постановки реакции остается добавить интеркалирующий краситель или зонд для детекции продукта амплификации, образец ДНК, праймеры и воду.
- Объем 5-кратной смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций по 25 мкл.
- Смесь 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.
- UDG и dUTP в состав смеси не входят.
- 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.
- 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](#)).

- Референсный краситель [ROX](#), входящий в состав смеси, позволяет нормировать интенсивность флуоресценции зондов и интеркалирующих красителей типа [dsGreen](#). Концентрация ROX была специально оптимизирована для работы на большинстве real-time амплификаторов, доступных на рынке.
- Смесь подходит для приложений, в которых не могут использоваться урацил-содержащие продукты амплификации.

Совместимость с оборудованием

Реакционная смесь ProbeMaster® ROX совместима с большинством амплификаторов для ПЦР в реальном времени, 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.

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.

Расчет на 1 реакцию объемом 25 мкл* с детекцией в режиме реального времени:

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь для кПЦР ProbeMaster ROX, 5x	5 мкл	
Прямой праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 200–600 нМ)
Обратный праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	
Зонд <i>или</i>	0,25–0,75 мкл 10 мкМ раствора	2,5–7,5 пмоль/реакцию (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	Добавляется отдельно в каждую пробирку в п.4
Общий объем 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 меньше 10 мкл не рекомендуется к работе.

3. В пробирки для ПЦР (стрипы или планшет) внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
4. 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, стрипов или заклейте планшет плёнкой, 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
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
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°C .

Условия хранения

- Транспортировка/Хранение: при температуре не выше -20°C — 12 месяцев в пределах срока годности. При температуре от 0 до $+25^{\circ}\text{C}$ — 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.