

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

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

Реакционная смесь ProbeMaster® Eva488 подходит как для проведения ПЦР в режиме реального времени с помощью интеркалирующего красителя Eva488, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Из-за отсутствия в составе UDG/dUTP реакционная 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+});
- интеркалирующий краситель Eva488.

Ключевые характеристики

- Объём 5-кратной смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций по 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 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®.
- 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, получение продукта для ТА-клонирования и др.

Совместимость с оборудованием

Совместима 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
Общий объем 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 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 менее 10 мкл не рекомендуется к работе.

3. В пробирки для ПЦР 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, 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°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.

- 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.