



Тільки для професійного використання

ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ

Суміш для ПЛР 2 × Multiplex PCR Mix -50



P-01



ТОВ «ВИРОБНИЧА ФІРМА СІМЕСТА»

65005, Україна, м. Одеса, вул. Мельницька, буд. 20А,

тел.: +380(48)705 35 65, e-mail: alexeygareev@simesta.com

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Суміш реагентів для ПЛР **2× Multiplex PCR Mix** – готова 2-кратна реакційна суміш, що містить усі необхідні компоненти для проведення мультиплексної ПЛР (визначення до 4 мішеней). Її склад оптимізований для отримання ідеальних результатів щодо процесивності та специфічності ампліфікації. Реакційна суміш **2× Multiplex PCR Mix** підходить для ПЛР в режимі реального часу, а також для ампліфікації ДНК з подальшою детекцією результатів методом електрофорезу.

Суміш реагентів для ПЛР **2× Multiplex PCR Mix** застосовується для PCR ампліфікації ДНК і розрахована на проведення 50 реакцій в об'ємі 20 мкл реакційної суміші. Може використовуватись в науково-дослідній лабораторії молекулярної біології і генетики, ДНК-діагностиці, тощо.

2. СКЛАД РЕАКЦІЙНОЇ СУМІШІ

- Таq ДНК-полімераза;
- суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів;
- ПЛР-буфер (містить Mg^{2+}).

3. КЛЮЧОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Об'єм 2-кратної суміші 500 мкл розрахований для проведення 50 реакцій по 20 мкл.

Суміш повністю готова до застосування, що знижує ризик контамінації зразків і значно економить час на постановку реакції. Для постановки стандартної ПЛР (з подальшим аналізом методом гель-електрофорезу) до суміші необхідно додати тільки зразок ДНК, праймери і воду. Для постановки кількісної ПЛР до суміші необхідно додати інтеркалюючий барвник або зонд для детекції продукту ампліфікації, зразок ДНК, праймери і воду.

Для детекції флуоресценції слід використовувати ДНК-зонд, мічений флуорофором і гасителем (гідролізовані

зонди, «молекулярні маяки», праймери типу «скорпіон») або два зонди, мічених флуорофорами, що утворюють FRET-пару. Крім ДНК-зондів, для детекції флуоресценції може використовуватися інтеркалюючий барвник ds Green.

Підходить для ПЛР фрагментів завдовжки до 3 тис. п.о., не більше ніж 70% GC, які не потребують високоточної ампліфікації.

Як матриця може використовуватися геномна, вірусна, плазмідна ДНК та ін.

Не містить UDG та dUTP.

4. МОЖЛИВИ ЗАСТОСУНКИ

Кількісна ПЛР (ПЛР-РВ) із застосуванням інтеркалюючих барвників типу dsGreen або зондів, що гідролізуються, стандартна ПЛР (з подальшим аналізом методом гель-електрофорезу) та ін.

5. СУМІСНІСТЬ ІЗ ОБЛАДНАННЯМ

Сумісна з ампліфікаторами будь-якого типу.

6. ПРОТОКОЛ

1. Розморозьте реакційну суміш, ретельно перемішайте, скиньте краплі центрифугуванням.
2. Змішайте компоненти реакції згідно з наведеною нижче таблицею у зазначеній послідовності з розрахунку на $(N+0,1N)$ реакцій, де N — необхідна кількість реакцій. Готову суміш перемішайте та скиньте краплі центрифугуванням.

Розрахунок на 1 реакцію об'ємом 20 мкл * з детекцією в режимі реального часу:

Компонент	Об'єм	Примітка
Реакційна суміш	10 мкл	
Суміш прямих праймерів	0,5-1,0 мкл 10 мкМ розчину кожного	Кінцева концентрація 200-400 нМ
Суміш зворотних праймерів	0,5-1,0 мкл 10 мкМ розчину кожного	Кінцева концентрація 200-400 нМ
Суміш зондів	0,25–0,75 мкл 10 мкМ розчину кожного	Кінцева концентрація 100-300 нМ
або Інтеркалюючий барвник	Відповідно до рекомендації виробника	
Деіонізована вода	Додається до загального об'єму реакції 20 мкл*	З урахуванням об'єму зразка ДНК, який буде додано до п.4
ДНК	2-5 мкл (кДНК, 50-100 нг геномної ДНК, 1-100 пг плазмідної ДНК)	Додається окремо до кожної пробірки в п.4
Загальний об'єм реакції	20 мкл*	При використанні іншого об'єму реакції слід перерахувати об'єми компонентів реакції із збереженням наведених пропорцій

Розрахунок на 1 реакцію об'ємом 20 мкл * з детекцією методом гель-електрофорезу:

Компонент	Об'єм	Примітка
Реакційна суміш	10 мкл	
Суміш прямих праймерів	0,5-1,5 мкл 10 мкМ розчину кожного	Кінцева концентрація 200-600 нМ
Суміш зворотних праймерів	0,5-1,5 мкл 10 мкМ розчину кожного	Кінцева концентрація 200-600 нМ
Деіонізована вода	Додається до загального об'єму реакції 20 мкл*	З урахуванням об'єму зразка ДНК, який буде додано до п.4
ДНК	2-5 мкл (кДНК, 50-100 нг геномної ДНК, 1-100 пг плазмідної ДНК)	Додається окремо до кожної пробірки в п.4
Загальний об'єм реакції	20 мкл*	При використанні іншого об'єму реакції слід перерахувати об'єми компонентів реакції із

		збереженням наведених пропорцій
--	--	---------------------------------

*Об'єм реакції можна змінювати в залежності від конкретного завдання, проте проводити реакцію в об'ємі менше 10 мкл не рекомендується.

3. У пробірки для ПЛР внесіть готову суміш без урахування об'єму зразка ДНК.

4. Внесіть у кожен пробірник окремих наконечником піпетки 2-9 мкл зразка ДНК/кДНК (кДНК, 30-100 нг геномної ДНК, 1-100 пг плазмідної ДНК). Після додавання ДНК сумарний обсяг реакції має становити 20 мкл. Закрийте кришки пробірок, скиньте краплі центрифугуванням.

5. Проведіть ампліфікацію ДНК за допомогою наведеної програми (температура відпалу праймерів розраховується індивідуально для кожної пари праймерів).

Стадія	Температура	Час	Кількість циклів
Активация Taq-полімерази	95°C	5 хв	1
Денатурація	95°C	10 с	40-50
Відпал праймерів (на цьому етапі повинна проводитися детекція флуоресценції)	55-65°C	10-20 с	
Елонгація	72°C	20-30 с	

6. У разі використання інтеркалюючого барвника, після проведення ампліфікації, щоб переконатися у відсутності неспецифічної ампліфікації, рекомендується провести плавлення амплікону в діапазоні від 60 до 95°C.

7. Для аналізу результатів ПЛР методом гель-електрофорезу: змішайте зразки з буфером для нанесення на гель і внесіть в лунки гелю, проведіть електрофорез.

8. При необхідності продукти ампліфікації можна зберігати при температурі -20°C.

7. УМОВИ ТРАНСПОРТУВАННЯ

Транспортувати суміш реагентів для ПЛР **2× Multiplex PCR Mix** необхідно при температурі від 2 до 8 °С не більше 5 діб. Уникати дії сонячних променів на складові суміші. Після закінчення транспортування набори необхідно зберігати відповідно до зазначених температур (-18 - -20 °С).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Суміш реагентів **2× Multiplex PCR Mix** треба зберігати при температурі мінус 18-20°С протягом усього терміну придатності (6 місяців з дати виробництва). Суміш реагентів зберігає стабільність до кінця терміну придатності, зазначеного на упаковці, за умови збереження цілісності упаковки виробника. Не використовувати після закінчення терміну придатності.