

**Базовый комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК
(форматы «Форез», «Flash», «Real-Time»)**

Состав (на 50 определений)

| Реактив | Количество | |
|---|------------|-------------|
| Комплект реагентов для ПЦР-амплификации | | |
| Смесь для амплификации, запечатанная парафином или | 20 мкл | 50 пробирок |
| Смесь для амплификации | 1000 мкл | 1 пробирка |
| Раствор Taq-полимеразы | 500 мкл | 1 пробирка |
| ПЦР-буфер ¹ | 200 мкл | 1 пробирка |
| Минеральное масло | 1000 мкл | 1 пробирка |
| Положительный контрольный образец (К+) ² | 75 мкл | 1 пробирка |
| Видоспецифичные праймеры ² | | |
| Видоспецифичные зонды ³ | | |

1 - в комплектах в формате «Flash»

2 - поставляется отдельно по желанию заказчика. Количество обговаривается отдельно.

3 - поставляется отдельно по желанию заказчика только в форматах «Flash», «Real-Time». Количество обговаривается отдельно.

Примечание. Комплекты реагентов могут поставляться в неалiquотированном виде. При этом вместо 50 пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, в наборе присутствует одна пробирка со смесью для амплификации.

Предварительные замечания

- Концентрация используемых праймеров должна составлять **100** пмоль/мкл, а зонда **50** пмоль/мкл.
- Комплекты реагентов могут поставляться с внутренним контролем (ВК). При этом температура отжига праймеров, используемых с базовым комплектом реагентов должна составлять около 64°C. Для наборов в форматах «Flash», «Real-Time» детекция сигнала ВК осуществляется в канале HEX.
- Размер ампликона, фланкированного специфическими праймерами, должен составлять 50-360 п.н. (если необходимо отличать ампликон ВК от фрагмента, образуемого специфическими праймерами на электрофореграмме, см. приложение).

Инструкция по применению

I. Постановка амплификации

1. Промаркируйте пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учетом пробирок для положительного контрольного образца - «К+» и для отрицательного контрольного образца - «К-»).

При использовании неалiquотированного набора раскройте по 19,7 мкл амплификационной смеси в каждую пробирку.

При использовании ПЦР-детектора «Джин» для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркируйте дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

Для постановки нескольких (N — все образцы, кроме фоновых) реакций смешайте в отдельной пробирке 10x(N+1) мкл раствора Taq-полимеразы, 0,125x(N+1) каждого праймера и 0,07x(N+1) мкл зонда. Тщательно перемешайте.

2. Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10,3 мкл тщательно перемешанного раствора.

2а. При использовании наборов в формате «FLASH» Смешайте 30 мкл ПЦР-буфера, 0,37 мкл каждого праймера и 0,2 мкл зонда, тщательно перемешайте.

В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10,3 мкл полученного раствора.

3. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла, плотно закройте пробирки.

4. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.

5. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку в пробирку, маркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.

6. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.

7. Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблице, (объем реакционной смеси 35 мкл).

II. Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации ДНК

1. **Формат «Форез»:** результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. табл. 1, приложение и инструкцию для проведения гель-электрофореза).
2. **Формат «Flash»:** результаты анализируют с помощью ПЦР-детектора «Джин» согласно инструкции к прибору или с помощью гель-электрофореза (см. табл. 1 и инструкцию для проведения гель-электрофореза). Пороговые значения фоновой флуоресценции для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля - 2,50 ед.
3. **Формат «Real-Time»:** автоматически с помощью прибора ДТ322/ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт («ДНК-Технология») или другого в соответствии с инструкциями к приборам или с помощью гель-электрофореза (см. табл. 2, приложение и инструкцию для проведения гель-электрофореза). Размер ампликона ВК составляет 560 п.н.

Таблица 1. Форматы «Flash» и «Форез»
Режим амплификации для амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

| Температура | Время | Количество циклов |
|-------------|--------------|-------------------|
| 94°C | 1 мин 30 сек | 1 |
| 94°C | 20 сек | 5 |
| 64°C | 5 сек | |
| 67°C | 5 сек | |
| 94°C | 1 сек | 40 |
| 64°C | 5 сек | |
| 67°C | 5 сек | |
| 10°C | Хранение | |

Таблица 2. Формат «Real-time». Режим амплификации для ДТ322/ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт («ДНК-Технология»)

| Температура | Время | Количество циклов |
|-------------|------------|-------------------|
| 94 °С | 1 мин 30 с | 1 |
| 94°С | 30 с | 5 |
| 64°С* | 15 с | |
| 67°С | 15 с | |
| 94°С | 10 с | 40 |
| 64°С* | 15 с | |
| 67°С | 15 с | |
| 10°С | Хранение | |

*- регистрация результатов

Условия хранения

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК следует хранить в темном месте при +2-8 °С в течение всего срока годности.