

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

Состав (на 50 определений)

Реактив	Количество		
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации			
Смесь для амплификации, запечатанная парафином или Смесь для амплификации	20 мкл	50 пробирок	1000мкл
Раствор Taq-полимеразы	1 пробирка		
ПЦР-буфер ¹	500 мкл	1 пробирка	
Минеральное масло	200 мкл	1 пробирка	
Положительный контрольный образец (K+) ²	1000мкл	1 пробирка	
Видоспецифичные праймеры ²	75 мкл	1 пробирка	
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 неаликвотированном 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 - «K+» и для отрицательного контрольного образца - «K-»).

При использовании неаликвотированного набора раскатайте 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 «K-», «K+», «ФОН»). В пробирки, маркированные «K-» и «ФОН», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку в пробирку, маркированную «K+», 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 «Фореуз»:** 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 «Фореуз»
 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 °C	1 мин 30 с	1
94°C	30 с	5
64°C*	15 с	
67°C	15 с	
94°C	10 с	40
64°C*	15 с	
67°C	15 с	
10°C	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.