

ArtMix ДНК-полимераза

Методические указания по применению

Каталожный №	Комплектация
<input type="checkbox"/> 255431	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix, 1,25 мл
<input type="checkbox"/> 255437	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix с UDG, 1,25 мл
<input type="checkbox"/> 255438	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix Low ROX, 1,25 мл
<input type="checkbox"/> 255440	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix Low ROX с UDG, 1,25 мл
<input type="checkbox"/> 255439	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix High ROX, 1,25 мл
<input type="checkbox"/> 255461	– 2-кратная смесь реагентов ArtMix High ROX с UDG, 1,25 мл

1. Описание

ArtMix ДНК-полимераза представляет собой универсальный готовый к использованию реагент для количественной и/или качественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (далее ПЦР-РВ). В состав **ArtMix ДНК-полимеразы** входят следующие компоненты:

- термостабильная ДНК-полимераза с «горячим стартом»;
- дНТФ;
- MgCl₂ (конечная концентрация в реакционной смеси 5 мМ);
- оптимизированный буфер.

Для удобства пользователей реагент **ArtMix ДНК-полимераза** выпускается в нескольких комплектациях. Комплектации UDG дополнены системой защиты от контаминации на основе урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и дУТФ. Комплектации **Low Rox** и **High Rox** дополнительно содержат в своем составе референсный краситель ROX. Конечная концентрация ROX в реакционной смеси составляет 30 нМ для комплектации **Low Rox** или 500 нМ для комплектации **High Rox**.

Преимущества реагента ArtMix:

Использование инактивированной ДНК-полимеразы, которая не обладает ферментативной активностью в условиях приготовления ПЦР-смеси, обеспечивает высокую специфичность и чувствительность реакции. Активация фермента происходит автоматически в процессе первого цикла денатурации ДНК.

Наличие в реакционной смеси дУТФ (в комплектациях UDG) приводит к тому, что все

продукты амплификации будут содержать в своем составе урацил. При этом UDG эффективно гидролизует урацил из одно- и двухцепочечных молекул ДНК (но не из олигомеров и дУТФ) во время предварительной инкубации реакционной смеси при 37 °С, предотвращая, таким образом, амплификацию ложноположительных результатов. UDG полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

Референсный краситель ROX (в комплектациях **Low Rox** и **High Rox**) позволяет корректировать погрешности, связанные с ошибкой автоматического дозатора и флуктуацией флуоресценции, путем нормализации интенсивности флуоресцентного сигнала при проведении количественной ПЦР. ROX не ингибирует ПЦР и не влияет на ее специфичность.

Использование **ArtMix ДНК-полимеразы** при проведении ПЦР-РВ обеспечивает получение воспроизводимых результатов с высокой чувствительностью (единичные копии ДНК) при определении количества геномной, плазмидной, вирусной и кДНК.

ArtMix ДНК-полимераза позволяет проводить мультиплексные ПЦР-РВ (до 4 одновременно-детектируемых мишеней). При постановке мультиплексных реакций рекомендуется оптимизация количества олигонуклеотидов и зонда для каждой мишени.

2. Область применения

- ПЦР-РВ с двумеченными зондами.

3. Стандартный протокол ПЦР-РВ использованием ArtMix ДНК-полимеразы

Для уменьшения ошибки пипетирования при постановке нескольких параллельных реакций рекомендуется приготовить общий ПЦР-премикс, содержащий все компоненты смеси за исключением ДНК-матрицы. После того, как аликвоты ПЦР-премикса будут внесены в предварительно промаркированные ПЦР-пробирки, в них добавляют соответствующую ДНК-матрицу.

1. Перед использованием разморозить и тщательно перемешать все компоненты ПЦР-смеси.

2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 1. Количество вносимых компонентов приведено для одной реакции объемом 25 мкл.

Таблица 1. Состав реакционной смеси объемом 25 мкл

Компонент	Объем	Конечная конц.
ArtMix (2-кратная смесь)	12,5 мкл	1-кратный
Прямой праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Обратный праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Зонд (50 мкМ)	0,15 мкл	0,3 мкМ
ДНК-матрица	Определяется пользователем	0,04 фг/мкл – 4 нг/мкл
Вода	Довести объем смеси до 25 мкл	

В зависимости от особенностей используемой ДНК-матрицы и задач исследования, состав реакционной смеси может быть оптимизирован:

- оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,05–1 мкМ;
- на одну реакцию объемом 25 мкл рекомендуется использовать 1 пг – 10 нг плазмидной, фаговой или бактериальной ДНК; 0,1–100 нг геномной эукариотической ДНК.

Рекомендуется дополнительно включать в анализ NTC (no template control) – реакцию, содержащую все компоненты реакции кроме ДНК-матрицы.

Допускается использование праймеров и зондов с другой начальной концентрацией.

Рекомендуемый объем ПЦР-смеси для одной реакции – 25 мкл. Однако при необходимости объем реакционной смеси может быть изменен с сохранением конечной концентрации входящих в нее компонентов.

3. Аккуратно перемешать компоненты реакционной смеси и осадить капли со стенок пробирки.

4. Провести ПЦР-РВ.

Рекомендуемый протокол проведения ПЦР-РВ для праймеров, имеющих T_m ≥ 60 °С приведен в таблице 2.

Таблица 2. Температурный профиль ПЦР-РВ для праймеров с T_m ≥ 60 °С

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	2 мин	1
Денатурация	95 °С	10 с	40
Отжиг праймеров/элонгация/считывание сигнала*	60 °С	15 с	

* – считывание данных должно быть установлено в конце данного цикла. Время в данном цикле может быть увеличено до 30 с и подбирается эмпирически

Рекомендуемый протокол проведения ПЦР-РВ для праймеров, имеющих T_m <60 °С приведен в таблице 3.

Таблица 3. Температурный профиль ПЦР-РВ для праймеров с T_m <60 °С

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	2 мин	1
Денатурация	95 °С	10 с	40–45
Отжиг праймеров/считывание сигнала**	50–60 °С*	15 с	
Элонгация	67 °С	15 с	

* – в зависимости от температуры плавления праймеров;

** – считывание данных должно быть установлено в конце данного цикла

4. Условия хранения и транспортировки

Транспортирование **ArtMix ДНК-полимеразы** осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37 °С (до 5 суток) или при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

ArtMix ДНК-полимераза хранится при температуре от -16 °С до -24 °С.

Допускается заморозка/оттаивание **ArtMix ДНК-полимеразы** не более 10 раз.

Срок годности – 1 год.