



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор отделения Диагностики

ЗАО «Рош-Москва»

О.В.Нестеров

«19» июля 2009г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Наборы реагентов и контрольных материалов для ПЦР-анализа в режиме реального времени к анализатору "ЛайтСайклер 2.0" (LightCycler 2.0)

Для лабораторных исследований.
ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *IN VITRO*.



**Набор реагентов для проведения
мультиплексного анализа ДНК с
гибридизационными зондами
LightCycler[®] Multiplex DNA
Master HybProbe**

Версия Март 2006

Готовая к применению реакционная смесь для проведения мультиплексного анализа ПЦР с “горячим” стартом на приборе LightCycler[®] 2.0

Кат. №. 04 340 019 001

Набор на 3 x 32 реакции

Хранить при температуре от -15 до -25°C

Содержание

1.	Назначение данного продукта.....	3
	Количество тестов	3
	Содержание набора	3
	Условия хранения и стабильность	3
	Необходимые дополнительные реагенты и оборудование	4
	Область применения	4
	Длительность постановки	5
2.	Работа с данным продуктом.....	6
2.1	Предварительные действия	6
	Образцы	6
	Отрицательный контроль	6
	Праймеры	6
	Гибридизационные зонды	6
	MgCl ₂	6
2.1.1	Планирование мультиплексных анализов	7
	Выбор комплекса олигонуклеотидов	7
	Создание нового мультиплексного анализа: Количественный анализ	8
	Создание нового мультиплексного анализа: Анализ кривой плавления	9
	Объединение удачных моноплексных анализов в эффективный мультиплексный анализ	9
2.2	Экспериментальный протокол	10
	Протокол для прибора LightCycler® 2.0	10
	Установка параметров флуоресценции и программы ПЦР	12
	Приготовление реакционной смеси для ПЦР	12
2.3	Цветовая компенсация	15
	Введение	15
	Принцип теста	15
	Длительность постановки	15
2.3.1	Предварительные действия	16
	Гибридизационные зонды	16
	Мастер микс	16
2.3.2	Экспериментальный протокол	17
	Протокол для прибора LightCycler® 2.0	17
	Приготовление реакционной смеси для ПЦР	18
	Сохранение файла цветовой компенсации	20
	Использование файла цветовой компенсации	20
2.4	Сопутствующие процедуры	21
	Предотвращение контаминации продуктами предшествующих реакций	21
	Двухстадийный ОТ-ПЦР	21
3.	Результаты.....	22
	Результаты количественного анализа	22
	Результаты анализа кривой плавления	23
	Результаты анализа уровня экспрессии	24
4.	Анализ ошибок.....	26
5.	Дополнительная информация о продукте.....	29
	Назначение данного продукта	29
	Список цитированной литературы	30
	Контроль качества	30
6.	Вспомогательная информация.....	31
6.1	Условные обозначения	31
	Текстовые обозначения	31
	Символы	31
6.2	Изменения относительно предыдущей версии	31
6.3	Информация для оформления заказов	31
6.4	Ограничения, налагаемые лицензией	33
6.5	Торговые марки	33

Количество тестов

Данный набор рассчитан на 96 реакций с конечным объемом одной реакции равным 20 мкл.

Содержание набора

Виял/крышка	Маркировка	Содержание и назначение
1a красная крышка	Master mix, 5x conc. (мастер микс 5x конц.)	• 3 x 128 мкл • Готовая к применению реакционная смесь для проведения мультиплексного анализа ПЦР с "горячим" стартом • Содержит модифицированную Taq ДНК-полимеразу, реакционный буферный раствор, смесь трифосфатов (дНТФ), содержащую дУТФ вместо дТТФ и 15 mM MgCl₂
2 голубая крышка	MgCl ₂ , 25 mM (стоковый раствор MgCl ₂)	• 1 x 1 мл • Для доведения концентрации MgCl₂
3 бесцветная крышка	H ₂ O, PCR grade (H ₂ O, со степенью очистки, подходящей для ПЦР)	• Для доведения конечной концентрации

Условия хранения и стабильность

- ⚠ Храните мастер микс при температурах от -15 до -25°C**
- Храните набор при температурах от -15 до -25°C до истечения срока годности, указанного на маркировке.
 - Набор транспортируется в сухом льду.
 - После вскрытия набора, хранить компоненты следует следующим образом:

Виял	Маркировка	Хранение
1 красная крышка	Master mix, 5x conc.	• Хранить при температурах от -15 до -25°C. • После первого размораживания набора, храните компоненты при температурах от +2 до +8°C максимум в течение четырех недель. • Избегайте повторные замораживания и размораживания!
2 голубая крышка	MgCl ₂ , 25 mM	
3 бесцветная крышка	Water, PCR-grade	Хранить при температурах от -15 до -25°C.
2 бесцветная крышка		Хранить при температурах от -15 до -25°C.

Необходимые дополнительные реагенты и оборудование	Дополнительные реагенты и необходимое оборудование для проведения ПЦР-реакций на приборе LightCycler® 2.0 с помощью набора LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe: - Капилляры LightCycler® * (20 мкл). - Стандартная настольная микроцентрифуга с ротором для реакционных пробирок на 2,0 мл. Ⓢ В комплект поставки системы LightCycler® 2.0 входят адаптеры, которые позволяют производить центрифугирование капилляров LightCycler® в стандартном микроцентрифужном роторе. или - Центрифуга карусельного типа LC Carousel Centrifuge 2.0* вместе с каруселями Sample LightCycler® 2.0 (опционально). Ⓢ Для того, чтобы адаптировать карусель Sample Carousel LightCycler® 2.0 для центрифуги карусельного типа LC Carousel Centrifuge 2.0 Вам понадобится набор LC Carousel Centrifuge 2.0 Rotor Set*. - Набор для цветовой компенсации LightCycler® Color Compensation Set* (опционально*). - Урацил-ДНК Гликозилаза LightCycler Uracil-DNA Glycosylase* (UNG) (опционально†). - Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным фильтром для автоматических дозаторов. - Автоматические дозаторы и одноразовые наконечники с поршнем. - Стерильные реакционные пробирки для приготовления мастер миксов и разведений. Ⓢ * Более детальную информацию о применении цветовой компенсации во время проведения экспериментов в одном капилляре с парами гибридационных зондов меченных красителем Red 640 и 705 смотрите в главе "Сопутствующие процедуры". Ⓢ † Более детальное описание предотвращения контаминации при переносе исследуемых материалов смотрите в главе "Сопутствующие процедуры". Используйте только LightCycler Uracil-DNA Glycosylase в комбинации с набором LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe.
Область применения	*поставляются Roche Applied Science, более детально смотрите в главе Информация для оформления заказов. Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe создан для легкой постановки мультиплексного ПЦР в реальном времени в капиллярах LightCycler® на приборе LightCycler® 2.0. Набор можно использовать для амплификации и детекции любой ДНК или кДНК-мишени. Для проведения ПЦР Вам понадобится ДНК-матрица и гибридационные зонды. Также, используя мультиплексный анализ, Вы можете использовать данный набор для генотипирования полиморфизмов одного нуклеотида (SNPs), анализа мутаций и осуществления двухстадийного ОТ-ПЦР. ⚠ Длина ампликона не должна превышать 400 н.п. для мультиплексного ПЦР-анализа или 700 н.п. для моноплексного ПЦР-анализа. Для получения оптимальных результатов используйте ампликоны длиной ≤ 350 н.п. Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe можно использовать в сочетании с UNG для предотвращения контаминации продуктами предшествующих реакций во время проведения ПЦР. ⚠ Рабочие характеристики этого набора, описанные в этом руководстве, гарантированы только при использовании прибора LightCycler® 2.0.

**Длительность
постановки**

Процедура	Время
Опционально: разведение контрольной матрицы	5 мин
Программирование ПЦР	45 мин
Постановка ПЦР в системе LightCycler® 2.0 включая программу кривой плавления	60 мин
Общее время постановки	110 мин



Оцените таким же образом время, необходимое для создания дополнительного файла цветовой компенсации.

2.1 Предварительные действия

Образцы	Используйте различные образцы, пригодные для ПЦР до тех пор, пока они будут оставаться достаточно чистыми, концентрированными и незагрязненными ингибиторами ПЦР. Для эффективного выделения нуклеиновых кислот используйте: • Прибор MagNA Pure LC* вместе со специализированным набором для выделения нуклеиновых кислот – MagNA Pure LC reagent kit (для автоматизированного выделения). или • Набор для выделения нуклеиновых кислот с высокой степенью очистки High Pure Nucleic Acid Isolation Kit (для ручного выделения). ③ Дополнительную информацию можно найти в каталоге Roche Applied Science Biochemicals или в Интернете на сайте: www.roche-applied-science.com.								
Отрицательный контроль	Всегда вместе с образцами ставьте отрицательный контроль. Для того, чтобы приготовить отрицательный контроль, замените ДНК-матрицу на специальную H₂O для ПЦР (виал 3, бесцветная крышка).								
Праймеры	Оптимальная конечная концентрация праймеров должна лежать в пределах от 0,2 до 0,6 мкМ. Мы рекомендуем использовать начальную концентрацию каждого праймера равную 0,5 мкМ.								
Гибридизационные зонды	Используйте гибридизационные зонды с конечной концентрацией каждого зонда равной 0,2 мкМ. В некоторых случаях бывает полезно удвоить концентрацию зонда, меченного LightCycler® Red до 0,4 мкМ. ③ Более детальную информацию о планировании гибридизационных зондов и мечении их различными красителями, Вы можете узнать на Интернет сайте LightCycler® 2.0 System Special Interest Internet site www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler (навигация в системе поддержки SKроме того, программное обеспечение LightCycler® Probe Design Software 2.0 поможет Вам сконструировать гибридизационные зонды в комбинации с соответствующими праймерами для ПЦР.								
MgCl ₂	Для специфической и эффективной амплификации в системе LightCycler® 2.0 Вам необходимо оптимизировать концентрацию MgCl₂ для Вашей мишени. Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe содержит MgCl₂ с конечной концентрацией равной 0,3 мМ. Оптимальная концентрация MgCl₂ для проведения ПЦР в системе LightCycler® 2.0 варьирует от 3 до 5 мМ. В качестве начальной концентрации, мы рекомендуем использовать концентрацию равную 3 мМ. Нижеприведенная таблица показывает объем стокового раствора MgCl₂ (виал 2, голубая крышка), который Вам необходимо добавить в реакцию для того, чтобы увеличить концентрацию MgCl₂ (при конечном объеме реакции равном 20 мкл). <table border="1"> <tr> <td>Для того, чтобы достичь следующей конечной концентрации Mg²⁺ (мМ):</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr> <tr> <td>Добавьте следующее количество 25 мМ MgCl₂ из стокового раствора (мкл):</td><td>0</td><td>0,8</td><td>1,6</td></tr> </table>	Для того, чтобы достичь следующей конечной концентрации Mg ²⁺ (мМ):	3	4	5	Добавьте следующее количество 25 мМ MgCl ₂ из стокового раствора (мкл):	0	0,8	1,6
Для того, чтобы достичь следующей конечной концентрации Mg ²⁺ (мМ):	3	4	5						
Добавьте следующее количество 25 мМ MgCl ₂ из стокового раствора (мкл):	0	0,8	1,6						

2.1.1.1 Создание нового набора параметров для мультиплексного ПЦР-анализа

Выбор комплекса олигонуклеотидов	Параметр	Характеристика
	Длина праймера	18 – 25 нуклеотидов
	T_m праймера	$T_m \leq 60^\circ\text{C}$
	Длина зонда	20 – 30 нуклеотидов
	T_m зонда	Для правильного детектирования пиков плавления, T_m мутантного зонда должна быть меньше T_m зонда, который полностью связывается с матрицей. Разница в температурах плавления должна составлять примерно $\pm 3^\circ\text{C}$.
	Нуклеотидная последовательность	• Избегайте протяженной АТ-области в конце олигонуклеотида. • Избегайте комплементарности между олигонуклеотидами для уменьшения образования димеров праймеров.
	Длина ампликона	• Выбирайте различные длины ампликона (100 – 300 н.п.), отличимые от длин других ампликонов. • Ампликоны должны хорошо разделяться в агарозном геле для контроля их длины.
	Специфичность олигонуклеотидов	Проверьте возможность неспецифического связывания Ваших олигонуклеотидов с помощью BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

2.1.1 Планирование мультиплексных анализов, продолжение

Создание нового мультиплексного анализа:
Количественный анализ

- ① Создайте экспериментальный протокол:
 - Pre-incubation (предварительная инкубация): 10 мин при 95°C
 - Annealing Temperature (температура отжига): установите на 5°C ниже, чем самая низкая температура T_m олигонуклеотида
 - Annealing Time (время отжига): 5-15 сек
 - Elongation Temperature (температура элонгации): 72°C
 - Elongation Time (время элонгации): (длина самого длинного ампликона [н.п.]/25) сек
 - Melting curve (кривая плавления)
 - Cooling (охлаждение)
- ② Выполните моноплексные реакции. Используйте во всех случаях концентрацию праймера равную 0,5 мкМ и концентрацию зонда равную 0,2 мкМ. Проверьте специфичность амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. При обнаружении неспецифических продуктов амплификации увеличьте поэтапно температуру отжига на 2°C или оттитруйте концентрацию $MgCl_2$.
 - Все параметры должны исполняться тщательно при одних и тех же условиях.
- ③ Выполните каждую комбинацию параметров, например, для квадруплексного ПЦР-анализа осуществите моноплексный, дуплексный, триплексный и квадруплексный анализ. Используйте одну и ту же концентрацию/количество копий каждой матрицы. Найдите тот параметр, который будет для вас наиболее предпочтительным и тот параметр, который не будет наиболее предпочтительным (C_p (crossing point-точка пересечения), электрофорез в агарозном геле).
- ④ Поддерживайте концентрацию/количество копий каждой матрицы и увеличение/уменьшение концентраций праймеров (титрование праймера) до тех пор, пока все значения C_p будут в пределах ± 3 циклов, например, в квадруплексном анализе.
- ⑤ Выберите динамический диапазон Вашего мультиплексного анализа с помощью постепенного разбавления одного параметра и использования таких же концентраций других параметров.
 - ⑨ Значения флуоресценции могут опуститься ниже значений фона флуоресценции во время проведения поздних циклов мультиплексных анализов при количественном анализе в режиме реального времени. Этот эффект происходит из-за высоких концентраций ДНК (ампликона), которые влияют на характеристики буфера и тем самым уменьшают флуоресценцию в канале 530. Эти изменения в свою очередь могут вызвать образование неправильных сигналов C_p , которые, как правило, не влияют на интерпретацию Ваших результатов. Для того чтобы получить хорошие результаты, мы рекомендуем разбавлять Вашу матрицу или выполнять анализ с разделенным каналом 530 (например, канал 610/канал 530).

**Создание нового
мультиплекс-
ного анализа:
Анализ кривой
плавления**

Анализ кривой плавления является дополнительной стадией в экспериментальном протоколе. Данный вид анализа бывает полезен при генотипировании полиморфизма одного нуклеотида (SNPs) и при детекции мутаций.

- ① Создайте Ваш протокол кривой плавления.
- ② Выполните моноплексные реакции. Используйте во всех случаях концентрацию праймера равную 0,5 мкМ и концентрацию зонда равную 0,2 мкМ. Проверьте специфичность амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. При обнаружении неспецифических продуктов амплификации увеличьте поэтапно температуру отжига на 2°C или оттитруйте концентрацию $MgCl_2$.
 - Все параметры должны исполняться хорошо при одних и тех же условиях.
- ③ Проверьте Ваш анализ кривой плавления. Если в результате анализа образуются дополнительные пики, то Вы можете улучшить Ваши результаты с помощью ассиметричной ПЦР, которая улучшает амплификацию цепи ДНК, с которой связывается гибридизационный зонд. Например, оттитруйте праймер, который связывается с той же самой матрицей, с которой связывается гибридизационный зонд (при начальной концентрации праймера равной 0,5 мкМ). Используйте 100, 80, 60 и 40 % (0,5, 0,4, 0,3 и 0,2 мкМ) этого праймера и при этом, оставляйте концентрацию другого праймера все время равной 100% (0,5 мкМ).
- ④ Выполните мультиплексный анализ. Убедитесь в специфической амплификации Ваших ПЦР-продуктов с помощью анализа С_р и электрофореза в агарозном геле. Для улучшения чувствительности Вы можете оттитровать концентрацию праймера, используя оптимальное соотношение Ваших ассиметричных пар праймеров.

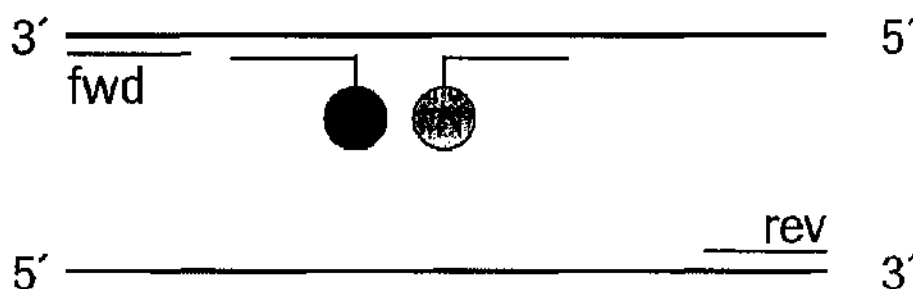


Рис.1: Пример ассиметричной ПЦР. В данном примере концентрация прямого праймера (fwd) должна быть уменьшена (или концентрация обратного праймера (rev) должна быть увеличена).

**Объединение
удачных
моноплексных
анализов в
эффективный
мультиплекс-
ный анализ**

Если Вы уже выполнили амплификацию на приборе LightCycler® 2.0 и хотите объединить вместе несколько параметров и включить их в одну постановку на приборе LightCycler® 2.0, то Вы должны убедиться в том, что:

- Протоколы амплификации для различных параметров не должны различаться по значениям температуры и времени отжига/элонгации. Например, если один параметр имеет температуру отжига равную 55°C и время равное 10 сек, а другой параметр имеет температуру отжига равную 60°C и время равное 15 сек, то выберите для мультиплексного анализа 55°C и 15 сек в качестве усредненного значения).
- Параметры амплифицируются специфично при применении нового протокола (используйте моноплексные анализы и подтвердите специфичность с помощью электрофореза в агарозном геле). Используйте обычные концентрации праймера или зонда и одни и те же концентрации MgCl₂.
- Выполните различные комбинации Ваших параметров с помощью моноплексного, дуплексного, триплексного и квадруплексного анализа. Найдите тот параметр, который будет для вас наиболее предпочтительным и тот параметр, который не будет наиболее предпочтительным. Увеличьте/уменьшите концентрацию праймеров до тех пор, пока все значения C_p будут в пределах ± 3 циклов (титрование праймера).
- Выберите наиболее низкую температуру и наиболее длинный профиль для анализа кривых плавления. Мы рекомендуем использовать ассиметричную ПЦР для определения оптимального анализа кривых плавления.

2.2 Экспериментальный протокол

**Протокол для
прибора
LightCycler® 2.0**

Нижеприведенные процедуры являются общим примером амплификации на приборе LightCycler® 2.0 с помощью набора LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe.

- ⚠** Перед приготовлением реакционной смеси запрограммируйте прибор LightCycler® 2.0.

Протокол для прибора LightCycler® 2.0, в котором используется набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe, состоит из следующих программ:

- **Pre-Incubation** (предварительная инкубация) (активация фермента и денатурация ДНК)
- **Amplification** (амплификация) ДНК-мишени
- **Melting Curve** (кривая плавления) для анализа ампликона (опционально; только для SNPs анализа и анализа мутаций).
- **Cooling** (охлаждение) ротора и термоблока

Более детальную информацию по программированию экспериментального протокола вы можете найти в руководстве пользователя к прибору (LightCycler® 2.0 Instrument Operator's Manual).

- ⚠** Установите '0' во всех других параметрах протокола, не перечисленных в нижеприведенных таблицах.

В нижеприведенной таблице представлены основные параметры, которые необходимо запрограммировать в систему LightCycler® 2.0 для постановки ПЦР с помощью набора LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe.

Analysis Mode (режим анализа)	Cycles (циклы)	Segment (сегмент)	Target Temperature (целевая температура) 1)	Hold Time (время удерживания)	Acquisition Mode (режим сбора данных)
Pre-Incubation					
Нет	1		95°C	10 мин 4)	Нет
Amplification					
Количественный	35-45	Denaturation (денатурация)	95°C	10 сек	Нет
		Annealing (отжиг)	Зависит от праймера 2)	5 - 15 сек 3)	Нет
		Extension (элонгация)	72°C 3)	Длина ампликона [н.н.]/25 сек 5)	Единичное измерение
Melting Curve (опционально)					
Кривые плавления	1	Denaturation	95°C	0 сек	Нет
		Annealing	T _m гибридизационного зонда -5 °C	30-60 сек	Нет
		Melting (плавление)	95°C Скорость снижения температуры 0,1°C/сек	0 сек	Непрерывное измерение
Cooling					
Нет	1		40°C	30 сек	Нет

- 1) Скорость изменения температуры - Temperature Transition Rate/Slope равна 20°C/сек, за исключением тех случаев, где это уже указано.
- 2) Если температура отжига праймера низкая (<55°C), то уменьшите скорость снижения температуры до 2 – 5°C/сек.
- 3) Во время проведения первых экспериментов установите Target Temperature (т.е. температуру отжига праймеров) на 5°C меньше, чем расчетная T_m праймеров. Считайте температуру плавления праймера T_m по следующей формуле, основанной на нуклеотидном содержании праймера: T_m = 2°C (A+T) + 4°C (G+C).
- 4) Если высокая активность полимеразы необходима на ранних циклах, то Вы можете иногда улучшить результаты с помощью увеличения времени предварительной инкубации до 15 мин.
- 5) Для более высокой точности в экспериментах по количественному определению мишени, будет полезно (в некоторых случаях) увеличить время элонгации в циклах амплификации.

Установка параметров флюоресценции и программы ПЦР

Параметры	Установка
Версии программного обеспечения LightCycler® 4.0 (и выше)	
Seek Temperature (Поиск температуры)	30°C
Default Channel (канал по умолчанию)	• в течение ПЦР • Выберите канал 610, 640, 670, или 705 в зависимости от вида красителя LightCycler® Red, используемого для мечения гибридационного зонда.
• для анализа	• Разделяется на канал 530 для экспериментов с одноцветным анализом. Выбирает канал 610, 640, 670, или 705 в зависимости от вида красителя LightCycler® Red, используемого для мечения гибридационного зонда. ⚠ В основном, эксперименты, которые разделяются с помощью канала 'Back-530', рекомендуются для разрешения мультиплексных анализов. Только в исключительных случаях допускается проводить мультиплексный анализ в экспериментах, которые подразделяются на канал 530.
"Max. Seek Pos" (Максимальное количество искомых позиций образцов)	Введите количество позиций образцов, которое следует отыскать прибору.
"Instrument Type" (Тип прибора)	"6 Ch.": для прибора LightCycler® 2.0 (выбранного по умолчанию)
"Capillary Size" (Размер капилляра)	Выберите значение "20 µl", которое означает использование в эксперименте капилляра с размером равным 20 мкл.
Приготовление реакционной смеси для ПЦР	Далее приведена методика приготовления реакционной смеси для ПЦР, рассчитанная на объем одной реакции, равный 20 мкл. Приготовленная смесь будет использоваться в ПЦР с одно- или многоцветным анализом.
	⚠ Не прикасайтесь к поверхности капилляров. Всегда надевайте перчатки во время работы с капиллярами.
	① В зависимости от общего количества образцов, поместите нужное количество LightCycler® капилляров в предварительно охлажденные адапторы, или в карусель LightCycler® Sample Carousel в предварительно охлажденный центрифужный стакан (бакет) LC Centrifuge Bucket.
	② Приготовьте 20 мкМ растворы, содержащие праймеры.
	③ Приготовьте 8 мкМ растворы гибридационных зондов.
	④ Разморозьте LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe 5x конц. (виал 1, красная крышка). Потом осторожно его перемешайте и храните во льду.

- 5 Приготовьте в охлажденной во льду 1,5 мл пробирке реакционную смесь для ПЦР по следующей схеме и осторожно перемешайте ее с помощью пипетирования.

Компонент	Объем (мкл)					Конечная конц.
	A	B	C	D	E	
Water, PCR-grade (вials 3, бесцветная крышка)	6	12	12	12	12	
Стоковый раствор MgCl ₂ (вials 2, голубая крышка)	-	-	-	-	-	3 mM
Прямой праймер A (20 мкл)	0,5	0,5	-	-	-	0,5 мкМ каждого
Обратный праймер A (20 мкл)	0,5	0,5	-	-	-	
Прямой праймер B (20 мкл)	0,5	-	0,5	-	-	
Обратный праймер B (20 мкл)	0,5	-	0,5	-	-	
Прямой праймер C (20 мкл)	0,5	-	-	0,5	-	0,2 мкМ каждого
Обратный праймер C (20 мкл)	0,5	-	-	0,5	-	
Прямой праймер D (20 мкл)	0,5	-	-	-	0,5	
Обратный праймер D (20 мкл)	0,5	-	-	-	0,5	
Флуоресцентный гибризационный зонд A (8 мкл)	0,5	0,5	-	-	-	0,2 мкМ каждого
Гибридизационный зонд меченый красителем LightCycler® Red A (8 мкл)	0,5	0,5	-	-	-	
Флуоресцентный гибризационный зонд B (8 мкл)	0,5	-	0,5	-	-	
Гибридизационный зонд меченый красителем LightCycler® Red B (8 мкл)	0,5	-	0,5	-	-	
Флуоресцентный гибризационный зонд C (8 мкл)	0,5	-	-	0,5	-	
Гибридизационный зонд меченый красителем LightCycler® Red C (8 мкл)	0,5	-	-	0,5	-	
Флуоресцентный гибризационный зонд D (8 мкл)	0,5	-	-	-	0,5	
Гибридизационный зонд меченый красителем LightCycler® Red D (8 мкл)	0,5	-	-	-	0,5	
Мастер микс (вials 1, красная крышка)	4	4	4	4	4	1x
Конечный объем	18	18	18	18	18	

- Q Для приготовления реакционной смеси более чем на одну реакцию умножьте объемы всех компонентов смеси из столбца "Объем" на количество реакций в эксперименте + одна дополнительная реакция.

- Q A: Многоцветный анализ (Multiplex Color Detection) с помощью красителей LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Red 670 и LightCycler® Red 705.
B: Одноцветный анализ (Monoplex Color Detection) с помощью красителя LightCycler® Red 610.
C: Одноцветный анализ (Monoplex Color Detection) с помощью красителя LightCycler® Red 640.
D: Одноцветный анализ (Monoplex Color Detection) с помощью красителя LightCycler® Red 670.
E: Одноцветный анализ (Monoplex Color Detection) с помощью красителя LightCycler® Red 705.

- 6 • Внесите по 18 мкл ПЦР-смеси в каждый предварительно охлажденный капилляр LightCycler®.
• Добавьте 2 мкл ДНК-матрицы.

-
- 7 Закройте каждый капилляр крышкой и поместите адапторы (содержащие капилляры) в стандартную настольную микроцентрифугу.

⚠ Центрифужные адапторы, находящиеся внутри центрифуги должны располагаться симметрично.

- Центрифугируйте при $700 \times g$ в течение 5 сек (3000 об/мин в стандартной настольной центрифуге). Также, Вы можете использовать для центрифугирования карусельную центрифугу LightCycler® Carousel Centrifuge.

-
- 8 Перенесите капилляры в карусель прибора LightCycler® 2.0.

- 9 Проводите термоциклирование Ваших образцов так, как это описано выше.
-

2.3 Цветовая компенсация

Введение

Если Вы используете гибридационные зонды-акцепторы, меченные различными красителями LightCycler® Red, в одном и том же капилляре, то Вы должны использовать файл для цветовой компенсации (предварительно созданный) для компенсирования перекрестного взаимодействия между отдельными каналами. Файл для цветовой компенсации (object) должен быть создан во время отдельной постановки ПЦР. Использование цветовой компенсации является необходимым условием при проведении мультиплексного цветового анализа с красителями LightCycler® Red 610, 640, 670 или 705 в одном капилляре.

Оптические фильтры каждого детекционного канала прибора LightCycler® 2.0 оптимизированы для различного максимума излучения флуоресцентных красителей. Тем не менее, у Вас могут появляться остаточные перекрестные взаимодействия между каналами, даже при своевременном использовании цветовой компенсации. Цветовая компенсация специфична для приборов LightCycler®. Поэтому Вы должны создавать файл для цветовой компенсации (object) для каждого прибора LightCycler®. Не существует универсальных наборов для цветовой компенсации для двухцветного анализа, с использованием отличных от LightCycler® Red 640/705 комбинаций красителей, или для многоцветного анализа на приборе LightCycler® 2.0. При проведении таких экспериментов Вы должны использовать свой собственный протокол цветовой компенсации. Файл для цветовой компенсации (object) должен быть подготовлен для каждого набора параметров и для тех случаев, когда Вы получаете новую партию олигонуклеотидов. В противном случае, цветовая компенсация не будет количественно оставаться для всех цветов, и перекрестные взаимодействия будут присутствовать в Ваших экспериментах. Набор для цветовой компенсации (The Color Compensation Set*) рекомендован только для использования двух красителей (LightCycler® Red 640 и LightCycler® Red 705). Вы можете активировать предварительно созданный файл цветовой компенсации (object) во время проведения эксперимента на приборе LightCycler® 2.0 или использовать его для анализа данных после проведения эксперимента.

③ Дополнительную информацию по использованию файла цветовой компенсации Вы можете узнать в руководстве для операторов LightCycler® 2.0 Instrument Operator's Manual или на интернет сайте LightCycler® 2.0 System Online Resource Site (www.lightcycler.com).

Принцип теста

Испускаемая интенсивность флуоресценции и спектры флуоресцентных красок строго зависят от температуры. Поэтому, температура, выбранная для получения данных, значительно влияет на перекрестное взаимодействие. Чтобы осуществить компенсацию перекрестного взаимодействия в многоцветных экспериментах при любой температуре между 40°C и 95°C, создание файла для цветовой компенсации включает стадию градиента температуры с непрерывным получением данных флуоресценции, измеренной во всех каналах.

Длительность постановки

Процедура	Время
Программирование ПЦР	45 мин
Постановка ПЦР в системе LightCycler® 2.0, включая программу плавления (градиент температуры)	60 мин
Общее время постановки	105 мин

2.3.1 Предварительные действия

Гибридизационные зонды

Флуоресцентно-меченые зонды перемешивают и добавляют к смеси для достижения конечной концентрации равной максимум 0,2 мкМ (например, если Вы используете 4-цветную систему, то Вам необходимо будет добавить 0,05 мкМ каждого флуоресцентно-меченого зонда, а если Вы используете 3-цветную систему, то Вам необходимо будет добавить 0,066 мкМ зонда). Каждый отдельный зонд, меченный красителем LightCycler® Red, добавляют к смеси для достижения конечной концентрации равной 1 мкМ; каждый зонд используется в отдельном капилляре.

Мастер микс

Используйте 4 мкл мастер микса (Master Mix) в смеси с конечным объемом равным 20 мкл (конечная концентрация: 1x).

2.3.2 Экспериментальный протокол

- Протокол для прибора LightCycler® 2.0**
- Создание файла цветовой компенсации (Color Compensation object) для прибора LightCycler® 2.0 состоит из следующих программ:
- Heating Step (нагревание)
 - Cycling Step (термоциклирование)
 - Temperature Gradient Step (градиент температуры)
 - Cooling Step (охлаждение)



Исходящая интенсивность флуоресценции и спектры флуоресцентных красок строго зависят от температуры, поэтому необходимо использовать градиент температуры. Выберите в качестве анализа либо компенсацию света "Color Compensation", либо кривые плавления "Melting Curves". Затем выберите непрерывное измерение "Continuous" в качестве режима сбора данных. Далее приведен стандартный протокол для прибора LightCycler® 2.0.

Analysis Mode (режим анализа)	Cycles (циклы)	Segment (сегмент)	Target Temperature (целевая температура) 1)	Hold Time (время удерживания)	Acquisition Mode (режим сбора данных)
Heating Step					
Нет	1		95°C	10 мин 4)	Нет
Cycling Step					
Количественный	35 - 45	Denaturation (денатурация)	95°C	10 сек	Нет
		Annealing (отжиг)	Зависит от праймера 2)	5 - 10 сек 3)	Единичное измерение
		Extension (элонгация)	72°C 3)	Длина ампликона [н.п.]/25 сек 3)	Нет
Temperature Gradient Step					
Цветовая компенсация	1	Denaturation (денатурация)	95°C	0 сек	Нет
		Annealing (отжиг)	T _m гибри- дизационного зонда-5°C 2)	30 - 60 сек	Нет
		Extension (элонгация)	95°C, скорость снижения температуры = 0,2°C/сек 1)	0 сек	Непрерывное измерение
Cooling Step					
Нет	1		40°C	30 сек	Нет

- 1) Скорость изменения температуры - Temperature Transition Rate/Slope равна 20°C/сек, за исключением тех случаев, где это уже указано.
- 2) Если температура отжига праймера низкая (<55°C), то уменьшите скорость снижения температуры до 2 - 5°C/сек.
- 3) Во время проведения первых экспериментов установите Target Temperature (т.е. температуру отжига праймеров) на 5°C меньше, чем расчетная T_m праймеров. Считайте температуру плавления праймера T_m по следующей формуле, основанной на нуклеотидном содержании праймера: T_m = 2°C (A+T) + 4°C (G+C).
- 4) Если высокая активность полимеразы необходима на ранних циклах, то Вы можете иногда улучшить результаты с помощью увеличения времени предварительной инкубации до 15 мин.
- 5) Для более высокой точности в экспериментах по количественному определению мишени, будет полезно (в некоторых случаях) увеличить время отжига и элонгации в циклах амплификации.

2.3.2 Экспериментальный протокол, продолжение

Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Далее идет описание приготовления растворов для цветовой компенсации.



Не прикасайтесь к поверхности капилляров. Всегда надевайте перчатки во время работы с капиллярами.

-
- ❶ Поместите 6 LightCycler® капилляров в предварительно охлажденные адапторы, или в карусель LightCycler® Sample Carousel в предварительно охлажденную центрифугу LC Carousel Centrifuge.
 - ❷ Приготовьте 8 мкМ растворы гибридизационных зондов.
 - ❸ Приготовьте 1 мкМ растворы гибридизационных зондов, меченных красителем LightCycler® Red.
 - ❹ Разморозьте LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe 5x конц. (виал 1, красная крышка). Потом осторожно его перемешайте и храните во льду.
-

2.3.2 Экспериментальный протокол, продолжение

- 5 Приготовьте в охлажденной во льду 1,5 мл пробирке реакционную смесь для ПЦР по следующей схеме и осторожно перемешайте ее с помощью пинетирования.

Компонент	Объем (мкл)						Конечная конц.	
	A	B	C	D	E	F	G	H
Water, PCR-grade (вials 3, бесцветная крышка)	16	12	13,5	13,5	13,5	13,5		
Флуоресцентный гибридизационный зонд A (1 мкМ)	-	1	-	-	-	-	0,05 мкМ	1 мкМ
Флуоресцентный гибридизационный зонд B (1 мкМ)	-	1	-	-	-	-	каждого флуоресцентного зонда, конечная конц.	каждого зонда, меченного красителем LightCycler® Red
Флуоресцентный гибридизационный зонд C (1 мкМ)	-	1	-	-	-	-		
Флуоресцентный гибридизационный зонд D (1 мкМ)	-	1	-	-	-	-		
Флуоресцентный гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red A (8 мкМ)	-	-	2,5	-	-	-	0,2 мкМ	LightCycler® Red
Флуоресцентный гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red B (8 мкМ)	-	-	-	2,5	-	-		
Флуоресцентный гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red C (8 мкМ)	-	-	-	-	2,5	-		
Флуоресцентный гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red D (8 мкМ)	-	-	-	-	-	2,5		
Мастер микс (вials 1, красная крышка)	4	4	4	4	4	4	1x	1x
Конечный объем	20	20	20	20	20	20		

- Q Для приготовления реакционной смеси более чем на одну реакцию умножьте объемы всех компонентов смеси из столбца "Объем" на количество реакций в эксперименте + одна дополнительная реакция.

- Позиция ротора 1: A: Буфер контроль
- Позиция ротора 2: B: Флуоресцентные гибридизационные зонды
- Позиция ротора 3: C: Гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red 640
- Позиция ротора 4: D: Гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red 640
- Позиция ротора 5: E: Гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red 670
- Позиция ротора 6: F: Гибридизационный зонд, меченный красителем LightCycler® Red 705

G: Концентрация флуоресцентного зонда

H: Концентрация зонда, меченного красителем LightCycler® Red

- 6 Внесите по 20 мкл ПЦР-смеси в каждый предварительно охлажденный капилляр LightCycler®, расположенный в упомянутом выше положении.

- 7 Закройте каждый капилляр крышкой и поместите адапторы (содержащие капилляры) в стандартную настольную микроцентрифугу.

⚠ Центрифужные адапторы, находящиеся внутри центрифуги должны располагаться симметрично.

- Центрифугируйте при 700 x g в течение 5 сек (3000 об/мин в стандартной настольной центрифуге). Также, Вы можете использовать для центрифугирования карусельную центрифугу LightCycler® Carousel Centrifuge.

2.3.2 Экспериментальный протокол, продолжение

-
- 8 Перенесите капилляры в карусель прибора LightCycler® 2.0.
 - 9 Проводите термоциклирование Ваших образцов так, как это описано выше.
-

Сохранение файла цветовой компенсации

После сохранения эксперимента по цветовой компенсации, необходимо сгенерировать из экспериментальных данных файл цветовой компенсации (object). Для того, чтобы создать файл цветовой компенсации, действуйте как описано ниже:

-
- 1 Выберите опцию **“Color Compensation”** в опции **“Analysis”**.
 - 2 Нажмите на кнопку **“Save CC Object”**.
 - 3 Поместите Ваш файл (object) в папку **“Special Data\CCC”** и назовите ее Вашим именем пользователя (user name).
-

Использование файла цветовой компенсации

Вы можете использовать сохраненный файл цветовой компенсации при постановке любого эксперимента с гибридизационными зондами на приборе LightCycler® 2.0. Активируйте сохраненный файл цветовой компенсации для компенсации Ваших необработанных данных следующим образом:

-
- 1 Нажмите на опцию **“Color Compensation”**, находящуюся либо в модуле **“Run”**, либо в модуле **“Analysis”** открытого эксперимента
 - 2 Выберите соответствующие файлы (object) в опции **“Select Color Compensation”**.
 - 3 Для того, чтобы вернуться к необработанным данным, нажмите снова на кнопку **“Color Compensation”** и выберите **“None”**.
-

2.4 Сопутствующие процедуры

Предотвращение контаминации продуктами предшествующих реакций

Использование урицил-ДНК гликозилазы (Uracil DNA N-Glycosylase (UNG)) может помочь предотвратить контаминацию продуктами предшествующих реакций в ПЦР.

Принцип предотвращения контаминации заключается во введении дУТФ (дУТФ, компонент мастер микса этого набора) в продукты амплификации, и прогревании последующих ПЦР-смесей, содержащих UNG. Если дУТФ-содержащая контаминация присутствует в этих ПЦР-смесях, то она расщепляется с помощью UNG и высокой температуры в начальной стадии денатурации. Такие фрагменты уже не смогут служить матрицей для дальнейшего ПЦР.

⚠ С того момента, как Ваш фрагмент ДНК матрицы будет содержать тимидин вместо уридина, использование UNG станет неэффективным. Использование UNG может понижать температуру плавления (T_m) примерно на 1°C во время проведения дополнительного анализа кривой плавления.

Двухстадийный ОТ-ПЦР

Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe можно использовать для постановки двухстадийного ОТ-ПЦР.

Стадия обратной транскрипции (перевод РНК в кДНК) в двухстадийном ОТ-ПЦР отделена от других стадий реакции и поэтому ее проводят вне прибора LightCycler® 2.0. Последующую амплификацию и детекцию в режиме реального времени проводят с помощью стандартных процедур на приборе LightCycler® 2.0, используя кДНК в качестве исходного материала образца.

Любой из следующих реагентов рекомендован для перевода РНК в кДНК с помощью обратной транскрипции (более детально смотрите в разделе "Информация для оформления заказов"):

- фермент обратная транскриптаза - Transcriptor Reverse Transcriptase*
- набор для транскрипции первой цепи кДНК - Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit
- набор для транскрипции первой цепи кДНК в ОТ-ПЦР - First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)

Синтез кДНК проводят согласно подробным инструкциям, прилагаемым к наборам для синтеза кДНК.

⚠ Не используйте более 8 мкл неочищенной кДНК-матрицы для реакции с конечным объемом равным 20 мкл т.к., большие количества такой матрицы могут ингибировать ПЦР. Для определения оптимального количества ДНК-матрицы мы рекомендуем в начале эксперимента одновременно использовать неразбавленную и разбавленную в соотношении 1:10 и 1:100 кДНК-матрицу.

3. Результаты

Результаты количественного анализа

Приведенные ниже кривые амплификации были получены при проведении экспериментов с многоцветной детекцией и флуорофорами-акцепторами LightCycler® Red 640, LightCycler® Red 670 и LightCycler® Red 705. Показанные данные отображают результаты, которые были получены в канале 640, канале 670 и канале 705 с использованием цветовой компенсации.

На рисунках показаны значения флуоресценции относительно количества циклов. 2×10^4 копий плазмидной ДНК могут быть воспроизводимо детектированы при проведении анализа с помощью гибридационных зондов на приборе LightCycler® 2.0.



Рис.2а: Канал 640 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена А



Рис.2b: Канал 670 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена В



Рис.2с: Канал 705 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена С

3. Результаты, продолжение

Результаты анализа кривой плавления

Анализ кривой плавления используется для генотипирования полиморфизма одного нуклеотида (SNPs) и для детекции мутаций. Анализ кривой плавления является дополнительной процедурой, которая осуществляется после проведения ПЦР. Для детекции гена А были использованы гибридизационные зонды, меченные красителем LightCycler® Red 640, для детекции гена В были использованы гибридизационные зонды, меченные красителем LightCycler® Red 670 и для детекции гена С были использованы гибридизационные зонды, меченные красителем LightCycler® Red 705. Три различные плазмиды, несущие либо ген А, либо ген В, либо ген С, были растворены в одном миксе с разведением равным 2×10^4 копий.

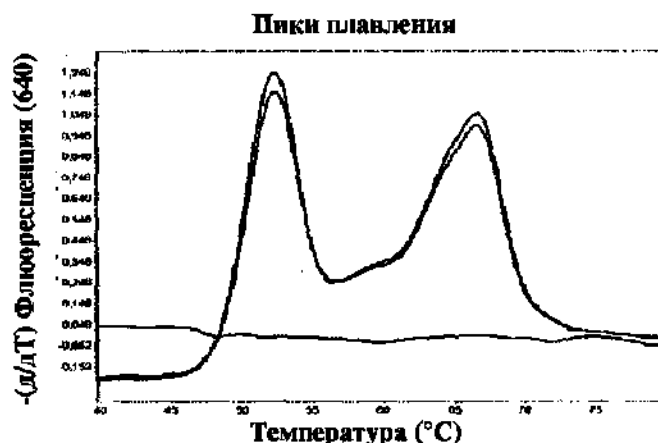


Рис.3а: Канал 640 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена А, гетерозигота.

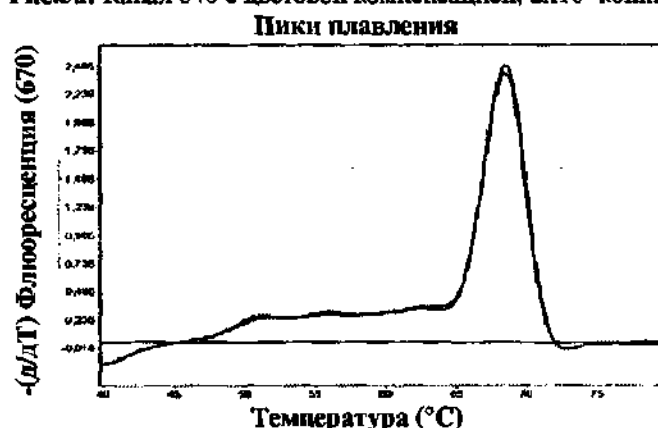


Рис.3б: Канал 670 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена В, гомозигота.

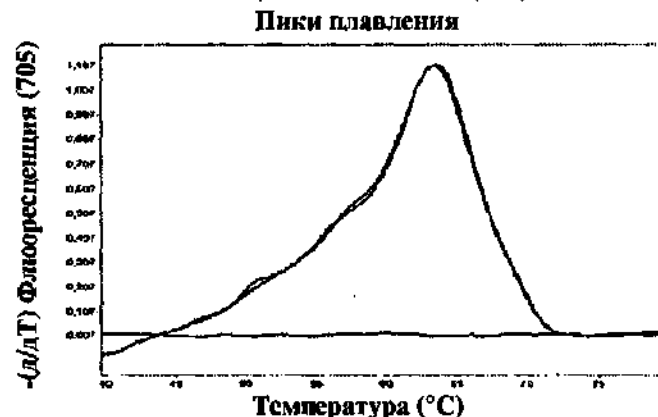


Рис.3с: Канал 705 с цветовой компенсацией; 2×10^4 копий гена С, гомозигота.

3. Результаты, продолжение

Результаты анализа уровня экспрессии

Следующие графики отображают уровни экспрессии четырех конститутивных генов в двух различных клеточных линиях. Рисунки 4 а, b, c, d показывают амплификацию кДНК с четырех конститутивных генов ($\beta 2M$, PBGD, HPRT и G6PDH) в двух различных клеточных линиях. Для этой амплификации был использован набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe.

Тотальная РНК была выделена из клеток с помощью набора реагентов для выделения РНК (MagNA Pure LC RNA Isolation Kit II) и использована в реакции обратной транскрипции для получения кДНК.

Каждый образец, содержащий транскрипты этих четырех генов, был проанализирован в одном капилляре с помощью многоцветного анализа, использующего в качестве акцептора-Флюорофора краситель LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Red 670 и LightCycler® Red 705.

Далее показаны результаты в канале 610 ($\beta 2M$), канале 640 (PBGD), канале 670 (HPRT) и в канале 705 (G6PDH) вместе с цветовой компенсацией.

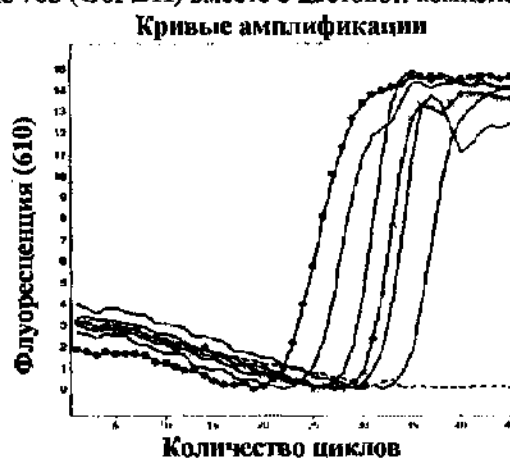


Рис 4 а: Канал 610 с цветовой компенсацией: графические данные амплификации в реальном времени $\beta 2M$ РНК стандартов в количестве от 5×10^6 до 5×10^3 копий (сплошные линии). 10 нг тотальной РНК из двух различных клеточных линий были протестированы на наличие экспрессии гена $\beta 2M$ (сплошные линии, помеченные звездочками или кружочками).



Рис 4 b: Канал 640 с цветовой компенсацией: графические данные амплификации в реальном времени PBGD РНК стандартов в количестве от 5×10^6 до 5×10^3 копий (сплошные линии). 10 нг тотальной РНК из двух различных клеточных линий были протестированы на наличие экспрессии гена PBGD (сплошные линии, помеченные звездочками или кружочками).

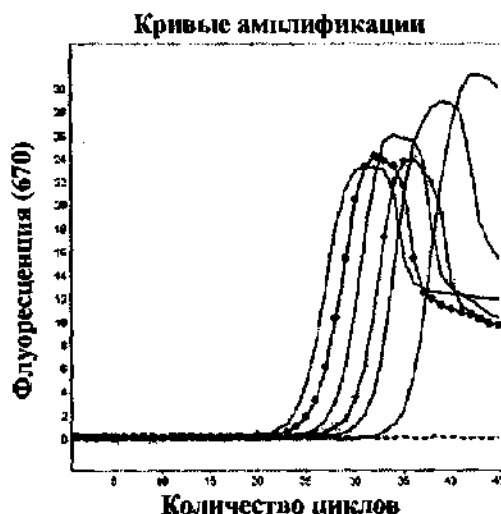


Рис 4 с: Канал 670 с цветовой компенсацией: графические данные амплификации в реальном времени HPRT РНК стандартов в количестве от 5×10^6 до 5×10^3 копий (сплошные линии). 10 нг total РНК из двух различных клеточных линий были протестированы на наличие экспрессии гена HPRT (сплошные линии, помеченные звездочками или кружочками).

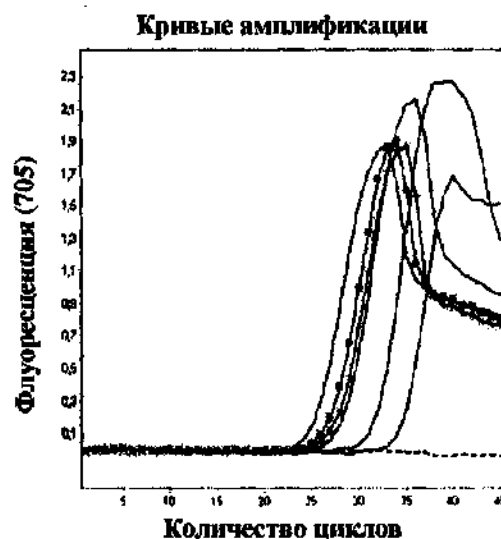


Рис 4 d: Канал 705 с цветовой компенсацией: графические данные амплификации в реальном времени G6PDH РНК стандартов в количестве от 5×10^6 до 5×10^3 копий (сплошные линии). 10 нг total РНК из двух различных клеточных линий были протестированы на наличие экспрессии гена G6PDH (сплошные линии, помеченные звездочками или кружочками).

4. Анализ ошибок

	Причина	Рекомендация
Амплификация достигает фазы плато в тот момент, когда термоциклирование еще не завершилось	- Очень высокое исходное количество нуклеиновой кислоты (НК) - Слишком большое количество циклов	Уменьшите количество циклов в программе термоциклирования.
Логарифмическая фаза начинается, когда программа термоциклирования заканчивается	Очень низкое исходное количество НК	- Улучшите условия ПЦР (например, концентрацию $MgCl_2$, концентрацию праймера или его конструирование). - Используйте больше начальной матрицы. - Повторите запуск программы.
Амплификация не детектируется	Неправильный канал был использован для отображения ампликации на экране дисплея в режиме онлайн	Выберите используемый канал на экране дисплея и поменяйте его. (Данные, которые были получены до этого изменения, будут сохранены.)
	Полимераза не достаточно активна	- Убедитесь, что в начале ПЦР была проведена стадия предварительной инкубации при 95°C в течение 10 мин. - Проверьте время денатурации при термоциклировании.
	Ошибки пипетирования или забыли добавить необходимые реагенты	- Найдите пропущенные реагенты. - Оттитруйте концентрацию $MgCl_2$. - Найдите пропущенные или дефектные красители.
	Измерения не происходят	Проверьте программу ампликации. Выберите значение "Single" (единичное измерение), как режим сбора данных в конце фазы отжига при проведении анализа с помощью гибридизационных зондов.
	Трудная матрица, например, GC-богатая.	Повторите ПЦР при тех же условиях, что и раньше, но добавьте увеличивающиеся количества диметилсульфоксида (DMSO). Конечная концентрация DMSO должна быть $\leq 10\%$. Ⓢ Пики плавления будут ниже при использовании увеличивающихся количеств DMSO.
	Слишком большой размер ампликона	Не конструируйте праймеры, которые будут образовывать ампликоны длиной более 400 н.п. при мультиплексном анализе и ампликоны длиной более 700 н.п. при моноплексном анализе. Если Вы будете использовать ампликоны большей, чем рекомендовано, длины, то эффективность амплификации будет уменьшаться. Оптимальная длина ампликонов должна быть ≤ 350 н.п.
	Неочищенный исходный материал образца ингибирует реакцию	Не используйте более 8-10 мкл ДНК для реакционной смеси с конечным объемом равным 20 мкл. Вторично очистите НК Вашего образца, чтобы гарантировать отсутствие ингибиторов реакции.
	Неподходящие гибридизационные зонды	Проверьте нуклеотидную последовательность зонда и его расположение (место посадки).

4. Анализ ошибок, продолжение

Очень низкая интенсивность флуоресценции	Причина Низкая концентрация или деградация красителя в реакционной смеси из-за несоблюдения условий хранения красителя.	Рекомендация • Храните реагенты при температуре от -15 до -25°C в защищенном от света месте. • Избегайте повторного замораживания и размораживания. • После размораживания храните набор при температуре от +2 до +8°C в течение не более 1 недели. • Вы можете улучшить слабые сигналы гибридизационного зонда с помощью увеличения концентрации зонда, меченного красителем LightCycler® Red в два раза, по сравнению с концентрацией зонда, меченного флуоресцеином.
	Слабая эффективность ПЦР (условия реакции не оптимизированы).	• Оттитруйте концентрацию $MgCl_2$ • Концентрация праймера должна варьировать в пределах 0,2-0,6 мкМ, а концентрация зонда в пределах 0,2-0,4 мкМ. • Проверьте температуру отжига праймеров и зондов • Проверьте экспериментальный протокол. • Всегда вместе с пробам ставьте положительный контроль.
	Температура плавления мистматч-гибрида, состоящего из стренда и гибридизационного зонда меньше, чем температура отжига. Поэтому гибридизационные зонды не могут связаться и создать сигнал (при проведении анализа мутаций с помощью гибридизационных зондов).	Это не будет влиять на эффективность амплификации. Позаботьтесь, чтобы кривая плавления начиналась при более низкой температуре, чем температура отжига используемая для ПЦР
Меняется интенсивность флуоресценции	Ошибки пипетирования.	Используйте канал 530 (например, 610/530) для уменьшения влияния ошибок пипетирования во время проведения одноцветного анализа с гибридизационными зондами
	Приготовленная реакционная смесь для ПЦР до сих пор находится в верхней части капилляра или в крышке образовался воздушный пузырек.	Повторите стадию центрифугирования.
	Жир с кожи на поверхности крышки капилляра	Всегда надевайте резиновые перчатки во время работы с капилляром.

4. Анализ ошибок, продолжение

	Причина	Рекомендация
Образец с отрицательным контролем даст положительный сигнал	Контаминация.	• Переделайте все подозрительные растворы. • Пипетируйте реагенты на чистом рабочем месте. • Закройте крышку пробирки с отрицательным контролем сразу после инкубирования. • Используйте термолабильную UNG для удаления контаминации продуктами предшествующих реакций.
	Очень низкие сигналы флуоресценции и поэтому фон кажется довольно высоким.	Следуйте основным стратегиям оптимизации, рекомендованным для проведения ПЦР в системе LightCycler® 2.0.
Высокий фон	Слишком высокая концентрация гибридизационных зондов.	Концентрация гибридизационных зондов должна быть в пределах 0,2-0,4 мкМ.
	Недостаточное количество гибридизационных зондов.	Приготовьте новую пару гибридизационных зондов.
Кривая амплификации уменьшается после достижения фазы плато во время выполнения поздних циклов	“Эффект крючка” (“Hook effect”): конкуренция между связыванием пары гибридизационных зондов и повторным отжигом ПЦР-продукта.	Не влияет на интерпретацию результатов. Его можно избежать с помощью ассиметричной ПЦР, который улучшает амплификацию стренда ДНК, с которым связывается гибридизационный зонд.
	Высокая концентрация ДНК/ампликона влияет на буферные условия, что приводит к уменьшению флуоресценции в канале флуоресценции 530.	• Не влияет на интерпретацию основных результатов. • Разведения Вашей матрицы уменьшают данный эффект. • Мы рекомендуем использовать, например, канал 610/канал 530 для получения оптимальной формы кривых плавления при проведении количественного анализа.
Значения флуоресценции при количественном анализе в реальном времени снижаются ниже исходного фона флуоресценции в поздних циклах. Это может вызвать неправильное образование Ср-сигналов в диапазоне уменьшающейся флуоресценции.	Изменения в составе реакционной смеси.	• Проверьте чистоту раствора ДНК-матрицы. Уменьшите изменения параметров, таких как концентрация $MgCl_2$, добавление термолабильной UNG и установок программы.
	• Гибридизационные зонды не гомогенны или содержат вторичные структуры • Псевдогены приводят к образованию побочных ПЦР-продуктов.	• Спланируйте новые гибридизационные зонды. • Проверьте ПЦР-продукты с помощью электрофореза в агарозном геле. • Вы можете оптимизировать пики плавления с помощью ассиметричной ПЦР. Данный вид ПЦР улучшает амплификацию стренда ДНК, с которым связывается гибридизационный зонд.
Температура плавления продукта меняется при повторных постановках одного и того же эксперимента		
Нечеткий пик плавления		

5. Дополнительная информация о продукте

5.1. Назначение данного продукта

Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe представляет собой готовую к применению реакционную смесь для детекции с помощью гибридизационных зондов. Реакционная смесь данного набора содержит модифицированную *Taq* ДНК-полимеразу, которая минимизирует образование неспецифических продуктов амплификации, контаминирующих искомым ПЦР-продукт. Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe специально разработан для проведения мультиплексного ПЦР анализа с горячим стартом в стеклянных капиллярах на приборе LightCycler® 2.0.

В данном наборе используется химически модифицированная термостабильная рекомбинантная *Taq* ДНК-полимераза, у которой отсутствует 5'-3'-экзонуклеазная активность из-за делеции в N-концевой области и которая неактивна при температуре ниже 75°C. Фермент активируется только при высоких температурах, когда праймеры уже не связываются неспецифически. Фермент полностью активируется (после удаления блокирующих групп) во время стадии предварительной инкубации (95°C, 10 мин) до начала термоциклирования.

Гибридизационные зонды представляют собой два различных олигонуклеотида, которые гибридизуются с комплементарной последовательностью амплифицируемого фрагмента во время фазы отжига циклов ПЦР. Первый зонд содержит на 5'-конце метку – красителя флюорофора LightCycler® Red (LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Red 670 или LightCycler® Red 705), а его 3'-конец фосфорилирован для того, чтобы он не удлинялся. Второй зонд содержит на 3'-конце метку красителя флуоресценции (Fluos). Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) между двумя флюорофорами будет происходить только после гибридизации этих двух зондов, потому что они будут находиться на достаточном расстоянии друг от друга. Во время FRET взаимодействия происходит возбуждение флюорофора-донора (Fluos) источником света прибора LightCycler® 2.0, и часть энергии этого возбуждения передается акцептору-Флюорофору (LightCycler® Red). Далее происходит измерение флуоресценции, которая испускается красителем флюорофором LightCycler® Red. Гибридизационные зонды, меченные LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Red 670 или LightCycler® Red 705 можно использовать как по отдельности, так и в комбинации для проведения экспериментов с одно- или многоцветной детекцией.

5. Дополнительная информация о продукте, продолжение

Список цитированной литературы

- 1 Gunson, R. et al. (2003) *J. Clin. Virol.* **26**(3), 369-373.
- 2 Exner, M.M. et al. (2002) *Mol Cell Probes* **16**(5), 351-357.
- 3 Markoulatos, P. et al. (2002) *J. Clin. Lab. Anal.* **16**, 47-51.
- 4 Lyon, E. (2001) *Expert Rev Mol Diagn* **1**(1), 92-101.
- 5 Wittwer, C.T. et al. (2001) *Methods* **25**(4), 430-442.
- 6 von Ahsen, N. et al. (2000) *Clin Biochem* **33**(7), 535-539.
- 7 PCR Manual, Roche Diagnostics (1999) 2nd edition (1999) 2, 52-58.
- 8 Birch, D.E. et al. (1996) *Nature* **381**, 445-446.
- 9 Kellogg, D.E. et al. (1994) *Biotechniques* **16**, 1134-1137.
- 10 Chou, Q. et al. (1992) *Nucleic Acid Res.* **20**, 1717-1723.

Контроль качества

Набор LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe функционально протестирован с помощью прибора LightCycler® 2.0.

6. Вспомогательная информация

6.1 Условные обозначения

Текстовые обозначения Для выделения и запоминания информации в данной инструкции применяются следующие текстовые обозначения:

Текстовое обозначение	Назначение
Последовательные стадии промаркированы ①, ② и т.д.	Стадии процесса, происходящие в указанном порядке.
Этапы инструкции промаркированы ●, ● и т.д.	Этапы процедуры, которые необходимо выполнять в указанном порядке.
Звездочка *	Обозначает, что данный продукт можно приобрести у Roche Applied Science.

Символы В данной инструкции для выделения важной информации используются следующие символы:

Символ	Описание
Ⓢ	Внимание: Дополнительная информация о данной теме или процедуре.
⚠	Важно: Данная информация необходима для успешного выполнения процедуры или работы с продуктом.

6.2. Изменения относительно предыдущей версии

- Исправлена ошибка в протоколе кривой плавления “ Melting ”: Скорость изменения температуры равна 0.1°C/сек в отличии от неправильного значения 20°C/сек.
- Исправлена неправильная формулировка в главе 2.3.1. Каждый отдельный зонд (а не все зонды, как это было написано ранее), меченный красителем LightCycler® Red, добавляют к смеси для достижения конечной концентрации равной 1 мкМ.

6.3. Информация для оформления заказов

Roche Applied Science предлагает большой выбор реагентов и систем для биологических исследований. Для полного знакомства с продукцией и инструкциями, посетите нашу домашнюю страницу www.roche-applied-science.com и наши специальные Интернет сайты:

- Системы LightCycler® для ПЦР в реальном времени (система LightCycler® 2.0, система LightCycler® 480 и универсальная библиотека зондов): <http://www.lightcycler-online.com>
- Автоматизированное приготовление образцов (прибор MagNA Lyser, компактная система MagNA Pure и системы MagNA Pure LC): <http://www.magnapure.com>

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Приборы и аксессуары	Прибор LightCycler® 2.0	1 прибор вместе с аксессуарами	03 531 414 001
	Капилляры LightCycler® (20 мкл)	1 упаковка (8 коробок по 96 капилляров и специальных пробок в каждой)	11 909 339 001
	Капилляры LightCycler® (100 мкл)	1 упаковка (8 коробок по 96 капилляров и специальных пробок в каждой)	03 337 090 001
	LC Carousel Centrifuge 2.0 (Центрифуга карусельного типа)	1 центрифуга вместе с ротором и центрифужным стаканом (бакетом)	03 709 507 001 (115 V) 03 709 582 001 (230 V)
Программное обеспечение	Программное обеспечение LightCycler® Software версии 4.05	1 пакет программ	04 717 392 001
	Программное обеспечение LightCycler® Probe Design Software версии 2.0	1 пакет программ	04 342 054 001
Наборы LightCycler для ПЦР	LightCycler® DNA Master HybProbe (Набор реагентов для анализа ДНК с гибридизационными зондами)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	12 015 102 001 12 158 825 001
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Набор реагентов для анализа ДНК с гибридизационными зондами)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	03 003 248 001 12 239 272 001
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Набор реагентов «Плюс» для анализа ДНК с горячим стартом и гибридизационными зондами)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	03 515 575 001 03 515 567 001
	LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe, 100 µl Reactions (Набор реагентов «Плюс» для анализа ДНК с горячим стартом и гибридизационными зондами (100 мкл))	1 набор (384 реакции)	03 752 178 001
	LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Набор реагентов для анализа ДНК с красителем SYBR Green I)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	12 015 099 001 12 158 817 001
	LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Набор реагентов для анализа ДНК с горячим стартом и красителем SYBR Green I)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	03 003 230 001 12 239 264 001
	LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I (Набор реагентов «Плюс» для анализа ДНК с горячим стартом и красителем SYBR Green I)	1 набор (96 реакций) 1 набор (480 реакций)	03 515 869 001 03 515 885 001
	LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I, 100 µl Reactions (Набор реагентов «Плюс» для анализа ДНК с горячим стартом и красителем SYBR Green I (100 мкл))	1 набор (384 реакции)	03 752 186 001
	LightCycler® Color Compensation Set (Набор реагентов для цветовой компенсации)	1 комплект (5 реакций)	12 158 850 001
	LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (Фермент урацил ДНК-гликозилаза)	100 ед. (50 мкл)	03 539 806 001
Вспомогательные наборы и реагенты			

6.4 Ограничения, налагаемые лицензией

ОГРАНИЧЕННАЯ ЛИЦЕНЗИЯ:

Лицензия по не принадлежащим США аналогам патентов U.S. Patents Nos 4,683,202, 4,683,195 и 4,965,188 принадлежащих F. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche") для использования в исследовательских и опытно-конструкторских работах, имеет текущие лицензионные начисления и авансовый платеж. Стоимость данного продукта включает ограниченную, не передающуюся лицензию по текущим лицензионным начислениям на использование только этого количества продукта в практике полимеразной цепной реакции (ПЦР) и сопутствующих процедурах, описанных в вышеупомянутых лицензиях, исключительно только для научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ покупателей, когда данный продукт совместно используется с термоциклером, чье использование покрыто авансовым платежом. Для полной свободы действий вам необходимо купить права по авансовому платежу до окончания права пользования. Эти права по авансовому платежу могут быть куплены у Applied Biosystems или приобретены при покупке авторизованного термоциклера. Данный продукт представляет собой авторизованный реагент, который может быть использован по сублицензиям сервиса от Applied Biosystems по вышеупомянутым патентам.

Стоимость данного продукта включает ограниченную, не передающуюся лицензию по U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,245,514 и соответствующие патентные притязания вне территории США, лицензированные Idaho Technology Inc., для использования только этого количества продукта для проведения экспериментов с помощью гибридизационных зондов и соответствующих процедур, описанных в вышеупомянутых патентах только для научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ покупателей.

Набор защищен авторскими правами других патентных притязаний, таких как аппараты или системы исков в U.S. Patent No. 6,814,934, и есть ограничения на использование данного продукта для различных целей или для выполнения коммерческих сервисных работ различного вида, включая использование набора без ограничения для получения гонорара или других коммерческих вознаграждений, определенно по смыслу или с процессуальным отводом (в силу неопровержимой правовой презумпции). Данный продукт предназначен только для исследовательских целей. Использование для диагностики требует дополнительной лицензии от Roche.

Дополнительную информацию по закупке лицензий для выполнения ПЦР в реальном времени можно получить у директора по лицензированию - Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Данный продукт частично защищен по патенту US 5,871,908, который совместно эксклюзивно лицензирован Evotec OAI AG.

Части программного обеспечения, которое использует система LightCycler® 480, лицензированы Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA.

6.5. Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, FASTSTART, HYBPROBE и MAGNA PURE являются торговыми марками Roche.

**Контактная
информация и
техническая
поддержка**

Если у Вас есть вопросы или Вы столкнулись с проблемами при работе с продукцией Roche Applied Science (RAS), пожалуйста, свяжитесь с нашей Службой технической поддержки. Наши специалисты обеспечат быструю и эффективную помощь.

Мы также просим связаться с нами, если у вас есть предложения по оптимизации работы с продукцией RAS или новым областям применения нашей продукции. Неоднократно такая информация от клиентов оказывалась полезной для RAS и мировой науки.

Задать вопросы, решить возникшие проблемы, предложить улучшения или новые области применения продукции Вы можете на нашем сайте **технической поддержки он-лайн**:

www.roche-applied-science.com/support

Чтобы позвонить или написать нам, посетите домашнюю старницу Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com, и выберите страну. Появится контактная информация для выбранной вами страны.

На домашней странице Roche Applied Science выберите **Printed Materials**, чтобы найти:

- Подробные инструкции
- FAQs: Протоколы и ссылки для биологических исследований
- Наш ежеквартальный бюллетень Biochemica Newsletter
- Данные по безопасности материалов
- Вкладыши к наборам и инструкции

Там же вы можете заказать печатные копии данных материалов.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

0306:04.389328001:2