



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»



М. Петрович

«02» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами, 5x1 мл (LightCycler 480 Probes Master, 5x1 ml); Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами, 10x5 мл (LightCycler 480 Probes Master, 10x5 ml); Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами, 1x50 мл (LightCycler 480 Probes Master, 1x50 ml)



Для лабораторных исследований.
Не рекомендуется использовать в диагностических целях.
Только для использования *IN VITRO*.

Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами

LightCycler® 480 Probes Master

Версия Февраль 2008

Готовая к применению реакционная смесь для ПЦР с “горячим” стартом в системе LightCycler® 480

Кат. №. 04 707 494 001 5 X 1 мл (5 X 100 реакций, объем одной реакции 20 мкл)

Кат. №. 04 887 301 001 10 X 5 мл (10 X 500 реакций, объем одной реакции 20 мкл)

Кат. №. 04 902 343 001 1 X 50 мл (5000 реакций, объем одной реакции 20 мкл)

Хранить при температуре от -15 до -25°C

www.roche-applied-science.com

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	4
2.	Работа с данным продуктом.....	5
2.1.	Предварительные действия	5
	Образцы	5
	Отрицательный контроль	5
	Праймеры	5
	Зонды	5
	MgCl ₂	5
2.2.	Методика проведения	6
	Протокол для прибора LightCycler® 480	6
	Приготовление реакционной смеси для ПЦР	8
2.3.	Сопутствующие процедуры	9
	Цветовая компенсация	9
	Предотвращение контаминации продуктами предшествующих реакций	9
	Двухстадийный ПЦР с обратной транскрипцией	9
3.	Результаты.....	10
4.	Анализ ошибок.....	11
5.	Дополнительная информация о продукте.....	13
	Назначение данного продукта	13
	Принцип теста	13
	Список цитированной литературы	14
	Контроль качества	14
6.	Вспомогательная информация.....	14
6.1.	Условные обозначения	14
	Текстовые обозначения	14
	Символы	14
6.2.	Изменения относительно предыдущей версии	14
6.3.	Информация для оформления заказов	15
6.4.	Ограничения, налагаемые лицензией	16
	Предупреждения покупателю	16
6.5.	Торговые марки	16

1. Назначение данного продукта

Количество тестов

Данный набор рассчитан на:

- 500 реакций (кат. №. 04 707 494 001)
 - 5000 реакций (кат. №. 04 887 301 001, 04 902 343 001)
- с конечным объемом одной реакции равным 20 мкл

Содержание набора

Номер пробирки и цвет крышки	Маркировка	Содержание и назначение
		А) кат. №. 04 707 494 001 Б) кат. №. 04 887 301 001 С) кат. №. 04 902 343 001
1 красная	LightCycler® 480 Probes Master 2x (2-х кратная реакционная смесь для ПЦР с "горячим" стартом в системе LightCycler® 480)	• А) 5 пробирок/в каждой по 1 мл • Б) 10 пробирок/в каждой по 5 мл • С) 1 пробирка/50 мл • 2-х кратная готовая к применению реакционная смесь для ПЦР с "горячим" стартом • содержит <i>Taq</i>-полимеразу с горячим стартом (FastStart <i>Taq</i> DNA Polymerase), реакционный буфер, смесь трифосфатов (дНТФ), содержащую дУТФ вместо дТТФ и 6,4 мМ $MgCl_2$
2 бесцветная	LightCycler® 480 Probes Master; H_2O , PCR-grade (H_2O , со степенью очистки, подходящей для ПЦР)	• А) 5 пробирок/в каждой по 1 мл • Б), С) 2 пробирки/в каждой по 25 мл • для доведения конечного объема реакционной смеси.

Условия хранения и стабильность

Хранить набор при температуре от -15 до -25°C до истечения срока годности, указанного на маркировке.

- Набор транспортируется во льду.
- После открытия набора, хранить компоненты следует следующим образом:

Номер пробирки	Маркировка	Хранение
1	LightCycler® 480 Probes Master 2x	• при температуре от -15 до -25°C • избегайте повторного замораживания и размораживания • после первого размораживания набор можно хранить не более 4 недель при температуре от +2 до +8°C
2	LightCycler® 480 Probes Master; H_2O , PCR-grade	• при температуре от -15 до -25°C



Конечная реакционная смесь (т.е. LightCycler® 480 Probes Master вместе с праймерами, зондом и матрицей) стабильна в течение 24 часов при комнатной температуре. Не допускайте при хранении попадания света!

1. Назначение данного продукта, продолжение

Дополнительное оборудование и необходимые реагенты	Дополнительные реагенты и необходимое оборудование для проведения ПЦР с помощью набора LightCycler® 480 Probes Master: • Прибор LightCycler® 480 I* или прибор LightCycler® 480 II* • 384-луночный планшет для прибора LightCycler® 480* и 96-луночный планшет для прибора LightCycler® 480* • Стандартная бакет-ротаторная центрифуга с ротором для многолуночных планшетоов с соответствующими адапторами • LightCycler® 480 Uracil-DNA Glycosylase (Урацил-ДНК гликозилаза (UNG))* (опционально ++) • Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным фильтром для автоматических дозаторов • Автоматические дозаторы и одноразовые наконечники с поршнем • Стерильные 1,5 мл пробирки для приготовления растворов и разведений ++ более детальное описание предотвращения контаминации при переносе исследуемых материалов смотрите в соответствующей главе данной инструкции <i>*поставляются Roche Applied Science</i>
Область применения	Данный набор разработан для проведения научных исследований с помощью системы LightCycler® 480. Он представляет собой специально разработанную и готовую к применению реакцию смесь для обнаружения ДНК-мишеней при помощи гидролизных зондов во время проведения ПЦР с горячим стартом в системе LightCycler® 480. Реакционную смесь можно использовать для проведения различных типов ПЦР с помощью системы LightCycler® 480. Для получения наиболее лучших результатов, используйте многолуночные планшеты LightCycler® 480* Данный набор также помогает предотвратить контаминацию продуктами предшествующих реакций (при использовании LightCycler® 480 урацил-ДНК гликозилазы) или осуществить вторую стадию двухстадийного ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). ☞ Другие виды исследований также можно адаптировать для ПЦР в реальном времени на приборе LightCycler® 480. Например, можно использовать гибридизационные зонды, работающие по принципу резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), зонды с комплементарными концевыми последовательностями (Molecular Beacons) и специальные меченые праймеры (тип Scorpions). Любой из флуоресцентных красителей, используемых в системе анализа LightCycler® 480, должен соответствовать оптической системе прибора LightCycler® 480. LightCycler® 480 PCR Master Probes можно использовать для амплификации и обнаружения как ДНК, так и кДНК мишеней. Тем не менее, вы должны адаптировать протокол обнаружения к реакционным условиям прибора LightCycler® 480, а также сконструировать специальные праймеры и зонды для каждой мишени. Более подробную информацию смотрите в руководстве пользователя к прибору - LightCycler® 480 Operator's Manual.
Длительность постановки	⚠ Желательно, чтобы длина ампликонов не превышала 1000 н.п. ⚠ Для получения оптимальных результатов используйте ампликоны длиной 500 н.п. и менее. Рабочие характеристики этого набора, описанные в этом руководстве, гарантированы только при использовании системы LightCycler® 480. Варирует в зависимости от количества циклов и времени отжига. Например, одна постановка на приборе LightCycler® 480, включающая 40 циклов со временем отжига 20 сек и предварительной инкубацией проб в течение 5 мин, будет длиться примерно 44 мин.

2. Работа с данным продуктом

2.1. Предварительные действия

Образцы

• Используйте различные ДНК матрицы (например, геномную или плазмидную ДНК и кДНК), 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*, прибор MagNA Pure Compact* и набор для выделения ДНК - MagNA Pure LC DNA Isolation Kit (для автоматизированного выделения)
- набор HIGH PURE nucleic acid isolation kit* (для ручного выделения)

Более детальную информацию можно найти в каталоге Roche Applied Science Biochemicals или в Интернете на сайте www.roche-applied-science.com.

• Для одной реакционной смеси объемом 20 мкл используйте не более 500 нг геномной ДНК либо $10^1 - 10^{10}$ копий плазмидной ДНК. При увеличении объема реакционной смеси, количество ДНК матрицы увеличивается эквивалентно.



Если вы используете неочищенную кДНК, полученную с помощью реакции обратной транскрипции и содержащую высокие концентрации РНК и олигонуклеотидов, то, для улучшения результатов, используйте 2 мкл (и менее) этой смеси вместе с дополнительной предварительной инкубацией при 95°C в течение 10 мин. Это приведет к снижению значений точек пересечения (C_p) со сниженными стандартными отклонениями.

Отрицательный контроль

Всегда вместе с пробами ставьте отрицательный контроль, который следует готовить следующим образом:

• Вместо ДНК матрицы добавьте H_2O , со степенью очистки, подходящей для ПЦР (пробирка № 2). Этот контроль поможет обнаружить или исключить возможную контаминацию.

• (в двухстадийном ОТ-ПЦР) не добавляйте обратную транскриптазу для синтеза кДНК. Такой контроль поможет обнаружить наличие примесей ДНК в РНК-пробах, которое приводит к ложноотрицательным результатам.

Праймеры

Оптимальная конечная концентрация праймеров в реакционной смеси должна лежать в пределах от 0,3 до 1мМ. Мы рекомендуем использовать начальную концентрацию каждого праймера равную 0,5 мМ.



В начале оптимизируйте концентрацию праймера, а затем, с уже оптимизированными концентрациями праймера, оптимизируйте концентрацию зондов.



Оптимальной концентрацией праймера можно считать наименьшую концентрацию, которая приводит к наименьшему значению C_p и которая достаточна для определения концентрации фрагмента с помощью флуоресценции. Оптимальная конечная концентрация гидролизных зондов в реакционной смеси должна лежать в пределах от 0,05 до 0,2мМ.

Зонды



Оптимальной концентрацией зонда можно считать наименьшую концентрацию, которая приводит к наименьшему значению C_p и которая достаточна для определения концентрации мишени с помощью флуоресценции.



Гидролизные зонды следует отжигать с пробой после удлинения (достройки) праймеров для правильного формирования гидролизуемого гибрида. Для того, чтобы гибридационный комплекс был стабильным, температура плавления (T_m) зонда должна быть чуть-чуть выше, чем T_m праймеров. Кроме того, последовательность зонда должна учитывать возможность наличия мистматчей в ДНК матрице, так как впоследствии это повлияет на температуру отжига.

MgCl₂

Реакционная смесь в данном наборе уже содержит оптимальную концентрацию $MgCl_2$, которая подходит почти для всех комбинаций праймеров. Вам уже не надо корректировать концентрацию $MgCl_2$ для амплификации различных последовательностей.

2. 2. Методика проведения

• Протокол для прибора LightCycler® 480

Оптимизированный протокол для системы LightCycler® 480 приведен ниже:

- ⚠ Если тип прибора не будет выбран, то "LightCycler® 480 Instrument", будет отмечен по умолчанию для приборов LightCycler® 480-I или II
- ⚠ Перед приготовлением реакционной смеси запрограммируйте прибор LightCycler® 480

Протокол для прибора LightCycler® 480, для которого используется данный набор, состоит из следующих программ:

- **Предварительная инкубация (Pre-Incubation)** для активации *Taq* –полимеразы с горячим стартом и денатурации ДНК.
- **Амплификация (Amplification)** фрагмента ДНК
- **Охлаждение (Cooling)** термоблока

Более детальную информацию по программированию вы можете найти в руководстве пользователя к прибору (LightCycler® 480 Operator's Manual)

А) Протокол для ПЦР в 96-луночных планшетах

На нижеприведенной таблице представлены основные параметры, которые необходимо запрограммировать в систему LightCycler® 480 для постановки ПЦР в 96-луночном планшете с использованием набора LightCycler 480 Probe Master.

Установки (Setup)				
Выбор формата (Detection Format)		Тип блока (Block Type)	Реакционный объем (Reaction Volume)	
“Одноцветные” гидролизные зонды (Mono Color Hydrolysis Probes) или “Многоцветные” гидролизные зонды (Multi Color Hydrolysis Probes)		96	10-100 мкл	
Программы (Programs)				
Название программы (Program Names)		Количество циклов (Cycles)	Метод анализа (Analysis Mode)	
Pre-Incubation		1	Нет	
Amplification		45 ¹⁾	Количественный	
Cooling		1	Нет	
Целевые температуры (Temperature Targets)				
Целевая температура (°C) (Target (°C))	Режим сбора данных (Acquisition Mode)	Хранение (ч.мин.сек.) (Hold (hh. mm. ss))	Скорость изменения температуры °C/сек (Ramp rate (°C/s))	Сбор данных (ср. °C) (Acquisition (per °C))
Pre-Incubation				
95	нет	00:05:00 – 00:10:00 ³⁾	4,4 (или 2,0) ⁶⁾	-
Amplification				
95	нет	00:00:10	4,4 (или 2,0) ⁶⁾	-
Зависит от праймера ²⁾	нет	00:00:15 – 00:00:50 ⁴⁾	2,2 (Если, целевая температура ≥ 50°C) 1,5 (Если, целевая температура < 50°C) ⁵⁾	-
72	Единичное измерение	00:00:01	4,4 (или 2,0) ⁶⁾	-
Cooling				
40	нет	00:00:10	1,5	-

2.2. Методика проведения, продолжение

Б) Протокол для ПЦР в 384-луночных планшетах

На нижеприведенной таблице представлены основные параметры, которые необходимо запрограммировать в систему LightCycler® 480 для постановки ПЦР в 384-луночном планшете с использованием набора LightCycler 480 Probe Master.

Setup				
Detection Format		Block Type	Reaction Volume	
Mono Color Hydrolysis Probes или Multi Color Hydrolysis Probes		384	3-20 мкл	
Programs				
Program Names		Cycles	Analysis Mode	
Pre-Incubation		1	Нет	
Amplification		45 ¹⁾	Количественный	
Cooling		1	Нет	
Temperature Targets				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh. mm. ss)	Ramp rate (°C/s)	Acquisition (per °C)
Pre-Incubation				
95	нет	00:05:00 – 00:10:00 ³⁾	4,8	-
Amplification				
95	нет	00:00:10	4,8	-
Зависит от праймера ²⁾	нет	00:00:15 – 00:00:30 ⁴⁾	2,5 (Если, целевая температура ≥ 50°C) 2,0 (Если, целевая температура < 50°C) ⁵⁾	-
72	Единичное измерение	00:00:01	4,8	-
Cooling				
40	нет	00:00:10	2	-

- ¹⁾ 45 циклов обычно подходят практически для всех реакций. Если реакцию будут оптимизировать и она будет иметь крутую кривую амплификации и раннюю Ср (даже когда концентрации матрицы низкие), то 40 циклов будет вполне достаточно. Уменьшение числа циклов соответственно уменьшит время необходимое для данной реакции!
- ²⁾ Во время проведения первых экспериментов установите Target Temperature (т.е. температуру отжига праймеров) на 5°C меньше, чем расчетная Tm праймеров.
- ³⁾ Если высокая активность полимеразы необходима на ранних циклах, то вы можете иногда улучшить результаты путем дополнительной инкубации в течение 10 мин. Это особенно рекомендуется при больших реакционных объемах и при работе с неочищенными образцами кДНК в качестве матрицы. Не используйте более 2 мкл неочищенного образца кДНК!
- ⁴⁾ Точность количественного анализа мишени в отдельных случаях можно повысить путем выбора в циклах амплификации более длинного времени отжига и дотройки праймеров. Это особенно рекомендуется при больших реакционных объемах.
- ⁵⁾ Для пользователей программного обеспечения LightCycler® 480 Software 1.1: (скорость изменения температуры охлаждения (СИТО) для LightCycler® 480 Software 1.2 может быть установлена на максимум.)
- при использовании 96-луночных планшетов: установите СИТО на 2,2°C/сек при целевой температуре 50 °C и выше. А при температуре ниже 50°C - на 1,5°C/сек!
 - при использовании 384-луночных планшетов: установите СИТО на 2,5°C/сек при целевой температуре 50 °C и выше. А при температуре ниже 50°C - на 2,0°C/сек!
- ⁶⁾ Скорость изменения температуры равная 2.0 °C/сек рекомендуется для объемов равных 50 мкл и более.

2. 2. Методика проведения, продолжение

Приготовление реакционной смеси для ПЦР

Разморозьте реагент LightCycler® 480 Probes Master 2x (пробирка 1) и воду (пробирка 2). Далее приведена методика приготовления реакционной смеси для ПЦР рассчитанная на объем одной реакции равный 20 мкл.



Не прикасайтесь к поверхности многолуночного планшета во время его использования.

1

- Разморозьте растворы и убедитесь в том, что все компоненты полностью растворились. Перед открытием пробирок быстро сбросьте капли со стенок пробирок с помощью центрифугирования.
- Реакционную смесь осторожно перемешайте с помощью пипетирования и храните во льду.

2

Приготовьте 10-ти кратный раствор, содержащий праймеры для ПЦР и гидролизные зонды (primer/probe).

3

Приготовьте в охлажденной во льду 1,5 мл пробирке реакционную смесь для ПЦР с объемом одной реакции равным 20 мкл по следующей схеме:

Компонент	Объем
Вода для ПЦР (пробирка 2)	3 мкл
Смесь праймеров с зондами ¹⁾	
10-кратная	2 мкл
LightCycler® 480 Probes Master 2x (пробирка 1)	10 мкл
Конечный объем	15 мкл

¹⁾ Чтобы предотвратить возможное взаимодействие праймера с зондом во время хранения прогрейте смесь праймеров с зондами при 95°C в течение 1 мин. Эта стадия поможет улучшить чувствительность реакции.



Для приготовления реакционной смеси более чем на одну реакцию умножьте объемы всех компонентов смеси на число X. X - это количество реакций + 2 дополнительные реакции.

4

- Реакционную смесь осторожно перемешайте с помощью пипетирования. Не используйте для перемешивания вортекс!
- Внесите по 15 мкл ПЦР-смеси в каждую лунку многолуночного планшета.
- Добавьте 5 мкл ДНК матрицы.
- Заклейте лунки планшета специальной пленкой LightCycler® 480 Sealing Foil.

5

- Поместите многолуночный планшет в центрифугу и уравновесьте центрифугу соответствующим противовесом (например, другим многолуночным планшетом).
- Центрифугируйте планшет в течение 2 мин при 1500 x g на бакет-роторной центрифуге с ротором для многолуночных планшетов с соответствующими адапторами.

6

Установите многолуночный планшет в прибор LightCycler® 480.

7

Запустите рекомендованную выше программу для проведения ПЦР.



Если объем одной реакции отличается от стандартного (20 мкл), то удостоверьтесь, что вы правильно изменили протокол реакции. Вначале мы рекомендуем использовать те же самые времена удерживания, что и для объема равного 20 мкл.

2. 3. Сопутствующие процедуры

Цветовая компенсация

Дополнительную информацию по использованию файла цветовой компенсации вы можете узнать в руководстве для операторов LightCycler® 480 Operator's Manual или на интернет сайте LightCycler® 480 Online ResourceSite (www.roche-applied-science.com/lightcycler480).

Предотвращение контаминации продуктами предшествующих реакций

Использование UNG может помочь предотвратить контаминацию в ПЦР. Принцип предотвращения контаминации заключается в введении дУТФ (дУТФ, компонент реакционной смеси данного набора) в продукты амплификации и добавлении UNG в последующие ПЦР смеси. Если дУТФ-содержащая контаминация присутствует в этих ПЦР смесях, то она расщепляется с помощью UNG и высокой температуры в начальной стадии денатурации. И такие фрагменты, уже не смогут служить ДНК матрицей для дальнейшего ПЦР.



С того момента, как ваш фрагмент ДНК матрицы будет содержать тимидин вместо уридина, использование UNG станет неэффективным!



Всегда используйте LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase* для получения оптимальных результатов ПЦР с помощью данного набора. Следуйте инструкции, которая прилагается к ферменту.

Двухстадийный ОТ-ПЦР

Данный набор можно использовать для постановки второй стадии двухстадийного ОТ-ПЦР.

Первую стадию двухстадийного ОТ-ПЦР (перевод РНК в кДНК с помощью обратной транскрипции) проводят вне системы LightCycler®. Последующую амплификацию и детекцию в режиме реального времени проводят с помощью стандартных процедур системы LightCycler®, используя кДНК в качестве исходного материала образца.



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

- фермент Transcriptor Reverse Transcriptase
- набор Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

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



Для оптимизации количества ДНК матрицы мы рекомендуем в начале эксперимента одновременно использовать неразбавленную и разбавленную в соотношении 1:10 и 1:100 ДНК матрицу. Если вы используете неразбавленную кДНК в качестве матрицы, то мы рекомендуем удлинить предварительную инкубацию до 10 мин.

3. Результаты

Приведенные ниже кривые амплификации были получены при использовании данного набора. На рисунке показаны значения флуоресценции относительно количества циклов.

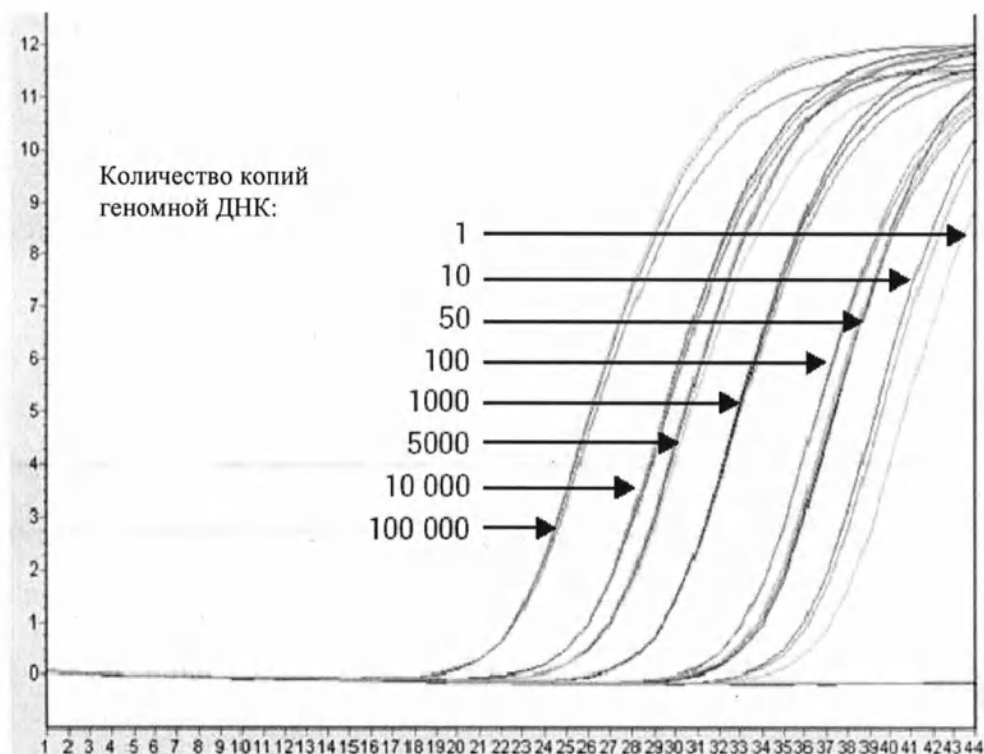


Рис.1. Кривые амплификации

Для получения кривых использовали серийные десятикратные и двукратные разведения геномной ДНК (в качестве матрицы), содержащей фрагмент гена Cytochrome P450 2C9, специальный набор праймеров и FAM/TAMRA-меченые гидролизные зонды, которые узнают фрагмент, состоящий из 196 н.п., гена Cytochrome P450 2C9.

4. Анализ ошибок

	Причина	Рекомендация
Кривые амплификации достигают фазы плато в тот момент, когда термоциклирование еще не завершилось	Очень высокое исходное количество нуклеиновой кислоты (НК)	Остановите программу циклирования кнопкой <i>End Program</i> (<i>Остановить программу</i>). Следующий цикл программа продолжит автоматически.
	Слишком большое количество циклов	Уменьшите количество циклов в программе циклирования
Логарифмическая фаза начинается, когда программа циклирования заканчивается	Слишком маленькое количество циклов	- Во время циклирования используйте кнопку <i>Add 10 Cycles</i> (<i>Добавить 10 циклов</i>) для увеличения количества циклов - Увеличьте количество циклов в программе циклирования - Используйте больше начального пробного материала - Оптимизируйте условия ПЦР (праймер/зонд конструирование, протокол)
Амплификация не детектируется	Неправильная комбинация фильтра была использована для отображения амплификации на экране дисплея	Выберите на экране дисплея соответствующую для вашего эксперимента комбинацию фильтра и начните заново.
	Неправильный формат определения был выбран для экспериментального протокола	Выберите соответствующий для вашего эксперимента формат и начните заново.
	Неочищенный материал образца ингибирует реакцию	- Используйте разведение для вашего образца равное 1:10 - Очистите НК вашего образца, чтобы гарантировать отсутствие ингибиторов реакции.
	Полимераза (FastStart Taq DNA Polymerase) не достаточно активна	- Убедитесь, что протокол реакции содержит стадию начальной предварительной инкубации (95°C в течение 5-10 мин) - Убедитесь, что время денатурации в течение амплификации составляет, по крайней мере, 10 сек.
	Ошибки пипетирования или забыли добавить необходимые реагенты	Найдите пропущенные и неправильно работающие реагенты.
	Размер ампликона > 1000 н.п.	Не конструируйте праймеры, которые будут образовывать ампликоны длиной более 1000 н.п. Эти ампликоны будут амплифицироваться не эффективно. Оптимальная длина ампликонов должна быть не более 500 н.п.
	Трудная матрица, например, GC-богатая.	- Оптимизируйте температуры и времена, использованные в циклах амплификации. - Оптимизируйте последовательность праймеров и зондов. - Повторите ПЦР, но добавьте увеличивающиеся количества диметилсульфоксида (DMSO) (используйте вплоть до 10% DMSO)

продолжение на следующей странице

4. Неисправности и методы их устранения, продолжение

	Причина	Рекомендация
Меняется интенсивность флуоресценции	Некоторые реагенты до сих пор находятся в верхней части лунки многолуночного планшета или образовался воздушный пузырек.	Повторите центрифугирование (например, 2 мин при 1500 x g), но следите за тем, чтобы все реагенты достигли дна и вышли все воздушные пузыри.
	Жир с кожи или грязь на поверхности многолуночного планшета	Всегда надевайте перчатки во время работы с многолуночным планшето́м.
Низкая интенсивность флуоресценции	Низкая концентрация или деградация красителей в реакционной смеси из-за несоблюдения условий хранения красителя.	• Не допускайте попадания света при хранении меченых красителем реагентов • Храните реагенты при температуре от -15 до -25°C и избегайте их повторного замораживания и размораживания
	Слабая эффективность ПЦР (условия реакции не оптимизированы).	• Проверьте концентрации реагентов и зондов • Оптимизируйте протокол
Образец с отрицательным контролем дает положительный сигнал	Выбранное время визуализации слишком мало.	• Выберите нужный формат детекции «Roche Detection Format» в комбинации с «активным» режимом детекции или • Увеличьте время визуализации при использовании ручного режима детекции Более детальную информацию смотрите в руководстве пользователя LightCycler® 480 Operator's Manual
	Контаминация	• Переделайте все подозрительные растворы • Пипетируйте реагенты на чистом рабочем месте • Используйте UNG для удаления контаминации продуктами предшествующих реакций
Высокий фон	Сигналы флуоресценции очень низкие, поэтому фон кажется довольно высоким	Следуйте основным рекомендациям по оптимизации запуска ПЦР в системе LightCycler® 480
	Слишком маленькое количество образца	Приготовьте новые разведения образцов
Высокое стандартное отклонение значений Ср	Загрязненная, гетерогенная ДНК матрица	• Увеличьте время предварительной инкубации до 10 мин • Используйте не более 2 мкл неочищенного образца кДНК.

5. Дополнительная информация о продукте

Назначение данного продукта

Набор LightCycler® 480 Probes Master это готовая к применению и специально разработанная реакционная смесь для детекции с помощью гидролизных зондов в многолуночных планшетах на приборе LightCycler® 480. Он включает фермент FastStart Taq DNA Polymerase для ПЦР с «горячим стартом», которая существенно улучшает специфичность и чувствительность ПЦР с помощью минимизации образования неспецифических продуктов амплификации (1, 2, 3, 4). FastStart Taq DNA Polymerase - это химически модифицированная термостабильная рекомбинантная Taq ДНК-полимераза (Taq DNA Polymerase), неактивная при температурах ниже 75°C. В отличие от Taq DNA Polymerase, FastStart Taq DNA Polymerase 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, 5-10 мин) до начала циклирования. Активация не требует дополнительных стадий, которые обычно используются в других методах проведения горячего старта.

Принцип теста

Специфичная детекция ПЦР-продуктов, зависит от специфичности последовательностей зондов меченых флюорофорами, последовательностям ПЦР-продуктов. Эти зонды гибридизуются с комплементарной последовательностью в целевом ПЦР-продукте. Для прибора LightCycler® 480 можно использовать зонды, меченые одной краской, гибридизационные зонды и гидролизные зонды. Гибридизационные и гидролизные зонды химически основаны на так называемом FRET принципе. FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) основан на переносе энергии от одного флюорофора (донора или репортера) к другому соседнему флюорофору (акцептору или гасителю).

Метод, в котором используются гидролизные зонды, с технической точки зрения, можно описать как гомогенный 5'-нуклеазный метод, так как для детекции накопления специфических фрагментов ДНК-мишеней в нем используется один 3'-неудлиняемый зонд, который расщепляется (гидролизуются) с 5'-конца в течение ПЦР (5). Этот единственный зонд содержит две краски (метки) – флуоресцентный репортер и гаситель, расположенные в непосредственной близости друг от друга. Гашение флуоресценции происходит в том случае, когда зонд находится в интактном (негидролизованном) состоянии и краски-гаситель находится на достаточном расстоянии, чтобы гасить флуоресценцию краски-репортера, за счет FRET. 5'-нуклеазная активность полимеразы приводит к расщеплению (гидролизу) гидролизных зондов во время ПЦР, вследствие чего происходит разделение краски-репортера и краски-акцептора. Краска-репортер уже больше не гасится, а испускает сигнал флуоресценции при возбуждении.

Прибор LightCycler® 480 может детектировать гидролизные зонды, меченные следующими красителями репортерами: LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Cyan 500, FAM or HEX. Эти меченные гидролизные зонды (по отдельности, либо в комбинации) позволяют проводить эксперименты с одно- или многоцветной детекцией.



Для многоцветного анализа мы рекомендуем гасители типа «темных гасящих красок» (dark quencher dyes). Их молекулы эффективно гасят флуоресценцию FRET-репортера, при этом, не испуская флуоресценцию самими собою. Roche Applied Science рекомендует использовать гаситель BHQ-2 (диапазон гашения 550 – 650 нм) для всех перечисленных выше красок-репортеров гидролизных зондов.

5. Дополнительная информация о продукте, продолжение

- Список литературы**
- 1 Chou, Q. et al. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20**, 1717-1723.
 - 2 Kellogg, D.E. et al. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* **16**, 1134-1137.
 - 3 Birch, D.E. (1996). Simplified hot start PCR. *Nature* **381**, 445-446.
 - 4 PCR Manual, Roche Diagnostics (1999) 2nd edition (1999) **2**, 52-58.
 - 5 Holland, P.M. et al (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 7276-7280.
- Контроль качества** Набор LightCycler® 480 Probes Master прошел все испытания в системе LightCycler® 480

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 ①, ② и т.д.	Этапы процедуры, которые необходимо выполнять в указанном порядке.
Звездочка *	Обозначает, что данный продукт можно приобрести у Roche Applied Science.

В данной инструкции для выделения важной информации используются следующие символы:

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

- Добавлен прибор LightCycler® 480-II

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 ПЦР в реальном времени (система LightCycler® 2.0, система LightCycler® 480 и Библиотека универсальных зондов): <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/>
- Автоматизированная пробоподготовка (прибор MagNA Lyser, система MagNA Pure Compas, и система MagNA Pure LC): <http://www.magnapure.com>
- Количественный ПЦР в реальном времени с зондами из Универсальной библиотеки зондов: <http://www.universalprobelibrary.com>

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Приборы	Прибор LightCycler® 480- II, 96-луночный	1 прибор с блоком управления и аксессуарами	05 015 278 001
	Прибор LightCycler® 480-II, 384-луночный	1 прибор с блоком управления и аксессуарами	05 015 243 001
Программное обеспечение	LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Программное обеспечение версии 1.5)	1 пакет программ	04 994 884 001
	LightCycler® 480 LIMS Interface Module (Интерфейс ЛИС)	1 пакет программ	05 066 310 001
Аксессуары	LightCycler® 480 Gene Scanning Software (Программное обеспечение для сканирования генов)	1 пакет программ	05 103 908 001
	LightCycler® 480 Multiple Plate Analysis Software (Программное обеспечение для анализа нескольких планшетов)	1 пакет программ	05 075 122 001
	LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit (96-well) Silver (Термоблок для 96-луночных планшетов, с серебряным покрытием)	96-луночный блок термоциклера, включающий крышку, блок для хранения и устройство для загрузки блока	05 015 219 001
	LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit (384-well) Silver (Термоблок для 384-луночных планшетов, с серебряным покрытием)	384- луночный блок термоциклера, включающий крышку, блок для хранения и устройство для загрузки блока	05 015 197 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 96-луночный планшет	50 планшетов с запечатывающими пленками	04 729 692 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 384-луночный планшет	50 планшетов с запечатывающими пленками	04 729 749 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 clear 96-луночный планшет, прозрачный	50 планшетов с запечатывающими пленками	05 102 413 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 clear 384-луночный планшет, прозрачный	50 планшетов с запечатывающими пленками	05 102 430 001
	LightCycler® 480 Sealing Foil Запечатывающая пленка	1x50 пленок	04 729 757 001
	LightCycler® 480 Sealing Foil Applicator Аппликатор для запечатывания планшетов пленкой		04 706 170 001

6.3. Информация для оформления заказов, продолжение

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Реагенты для ПЦР	LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Набор реагентов с SYBR Green I для ПЦР-анализа)	5 X 1 мл (5 X 10 реакций, 20 мл каждая) 10 X 5 мл (10 X 500 реакций, 20 мл каждая)	04 707 516 001 04 887 352 001
	LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Набор реагентов для анализа кривых плавления высокого разрешения)	1 набор (5 X 100 реакций, 20 мкл каждая)	04 909 631 001
	LightCycler® Genotyping Master (Набор реагентов для генотипирования)	1 набор (5 X 100 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 524 001
Универсальная библиотека зондов	LightCycler® RNA Master Hydrolysis Probe (Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами)	1 набор (5 X 100 реакций)	04 991 885 001
	Universal ProbeLibrary Set, Human (Набор универсальной библиотеки зондов, человек)	Библиотека из 90 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции.	04 683 633 001
	Universal ProbeLibrary Set, Mouse (Набор универсальной библиотеки зондов, мышь)	Библиотека из 90 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции.	04 683 641 001
Вспомогательные наборы и реагенты	Universal ProbeLibrary Set, Rat (Набор универсальной библиотеки зондов, крыса)	Библиотека из 90 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции.	04 683 650 001
	Universal ProbeLibrary Extension Set (Набор универсальной библиотеки зондов, дополнительный)	Библиотека из 75 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции (зонды с #91 до #165)	04 869 877 001
	LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (UNG) (Урацил-ДНК гликозилаза)	100 ед. (50 мкл)	03 539 806 001
	LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Набор реагентов для определения конститутивного h-G6PDH гена)	1 сет (96 реакций)	03 261 883 001
	Transcriptor Reverse Transcriptase (Обратная транскриптаза для транскрипции)	250 ед. 500 ед. 2000 ед.	03 531 317 001 03 531 295 001 03 531 287 001
	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Набор для транскрипции первой цепи кДНК)	1 набор	04 379 012 001
	First Strand cDNA Synthesis Kit for RTPCR (AMV) (Набор для транскрипции первой цепи кДНК в ОТ-ПЦР)	1 набор	11 483 188 001

6.4. Ограничения, налагаемые лицензией

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ПОКУПАТЕЛЮ ОГРАНИЧЕННАЯ ЛИЦЕНЗИЯ:

Для обеспечения 5'-нуклеазного процесса лицензия рекомендует использовать лицензионный набор 5' Nuclease Kit (5' нуклеазный набор), содержащий лицензионные зонды, или комбинацию наборов Authorized Core Kit (авторизованный основной набор) и Licensed Probe (лицензионные зонды), или лицензионные права, которые могут быть куплены у Applied Biosystems. Данный продукт представляет собой Authorized Core Kit без лицензионных зондов (Licensed Probe). Его стоимость включает ограниченную, не передающуюся защиту законом по патенту U.S. Patents Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,476,774, 5,219,727 и соответствующие патентные притязания вне территории США, принадлежащие Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche") на использование только этого количества продукта в практике 5'-нуклеазного процесса, особенно для частных внутренних исследований покупателей и разработок.

Этот продукт также является авторизованным основным набором (Authorized Core Kit) для использования с возможностью передачи лицензии от Applied Biosystems. Этот продукт защищен авторскими правами по патенту U.S. Patents Nos. 5,804,375, 6,214,979, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569 или соответствующим патентным притязаниям вне территории США, определенно по смыслу или в силу неопровержимой правовой презумпции.

Набор защищен авторскими правами других патентных притязаний (таких как аппараты или системы исков в U.S. Patent No. 6,814,934), и есть ограничения при выполнении 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.

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

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, FASTSTART, MAGNA PURE и HIGH 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.

0208.04719883001®



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»


«Рош-Москва» Диагностика

М. Петрович

«02» апреля 2009г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Набор реагентов для анализа кривых плавления высокого разрешения (LightCycler 480 High Resolution Melting Master)

Для общего лабораторного использования. Не предназначен для диагностических процедур. ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.

Roche

Набор реагентов для анализа кривых плавления высокого разрешения High Resolution Melting Master LightCycler® 480

Издание февраль 2008

Простая в использовании 2х конц. реакционная смесь для ПЦР и анализа кривых плавления высокого разрешения для применения в ПЦР-анализаторе LightCycler® 480

Кат.№ 04 909 631 001

Набор для 5 × 100 реакций (20 мкл)

Набор хранить при температуре от - 15 до - 25°C



**Не подвергать Мастер Микс (вial 1)
действию солнечного света.**

www.roche-applied-science.com

Содержание

1. Как действует продукт.....	1
Количество тестов.....	1
Содержание набора.....	1
Условия хранения и стабильность.....	1
Дополнительное оборудование и необходимые реактивы.....	2
Применение.....	2
Длительность проведения анализа	3
2. Как использовать продукт	4
2.1 Перед началом работы.....	4
Исходный материал.....	4
Праймеры	4
MgCl ₂	5
Отрицательный контроль.....	5
2.2 Последовательность операций.....	6
Системный протокол LightCycler® 480	6
Подготовка ПЦР-смеси.....	8
2.3 Смежные операции.....	9
Предотвращение перекрестной контаминации	9
3. Результаты.....	10
4. Выявление ошибок и их исправление.....	12
5. Дополнительная информация о продукте.....	14
Как действует продукт.....	14
Принцип проведения теста.....	14
Ссылки.....	15
Контроль качества.....	15
6. Дополнительная информация.....	16
6.1 Условные обозначения.....	16
6.1.1 Условные обозначения в тексте.....	16
6.1.2 Символы.....	16
6.2 Изменения, внесенные в данное издание.....	16
6.3 Как сделать заказ.....	17
6.4 Лицензия на ответственное использование.....	19
6.5 Торговые марки.....	19

1. Как действует продукт

Количество тестов

Набор предназначен для 5 × 100 реакций с объемом каждой реакции 20 мкл

Содержание набора	Виал/Колпачок	Ярлык	Содержание / Назначение
	1 зеленый	2× Мастер Микс,	• 5 × 1 мл • содержит FastStart <i>Taq</i> ДНК-полимеразу, реакционный буферный раствор, смесь дНТФ (с дУТФ вместо дТТФ), и краситель для анализа плавления высокого разрешения
	2 синий	MgCl ₂ , 25 мМ	• 2 × 1 мл • для регулирования концентрации MgCl₂
	3 бесцветный	H ₂ O, со степенью очистки, подходящей для ПЦР	• 5 × 1 мл • для регулирования конечного объема реакционной смеси.

Условия хранения и стабильность

- 📌 Набор следует транспортировать в сухом льду.
- При соблюдении температурного режима хранения в пределах от -15 до -25°C, набор остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.
 - После вскрытия набора, его компоненты следует хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице:

Виал	Ярлык	Условия хранения
1 зеленый	Мастер Микс, 2×конц.	• Хранить при температуре от -15 до -25°C. • Запрещается повторное замораживание и размораживание! • После первого размораживания Мастер Микс может храниться в течение 4 недель при температуре от -2 до -8°C. • Не подвергать воздействию солнечного света.
2 синий	MgCl ₂ , 25 мМ	• Хранить при температуре от -15 до -25°C.
3 бесцветный	H ₂ O, со степенью очистки, подходящей для ПЦР	

Дополнительное оборудование и необходимые реагенты

Для получения информации об оборудовании и дополнительных реагентах, необходимых для проведения реакции ПЦР с набором реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480

с использованием прибора LightCycler® 480 смотрите список, приведенный ниже:

- Прибор LightCycler® 480-I * или прибор LightCycler® 480-II *
- 384-луночный планшет LightCycler® 480* или 96-луночный планшет LightCycler® 480*
- Стандартная центрифуга с поворотной лопаткой с ротором для многолуночных планшетов с соответствующими адаптерами.
- Урацил-ДНК-гликозилаза LightCycler®* (опционально)

⑨ Для получения более подробной информации о том, как предотвратить перекрестную контаминацию, см. "Смежные операции" на странице 9.

- Не содержащие нуклеазы, аэрозоль-устойчивые наконечники для пипетки
- Пипетки с одноразовыми наконечниками с регулируемым объемом
- Стерильные реакционные пробирки для приготовления Мастер Миксов и растворов различных разбавлений.

** имеются в наличии в Roche Applied Science; для получения более подробной информации см. «Как сделать заказ»*

Применение

Набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 разработан для проведения научных исследований при помощи ПЦР-анализатора LightCycler® 480.

Набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 – это готовая к использованию 2-ух кратная реакционная смесь для проведения ПЦР с «горячим стартом», разработанная для амплификации и детекции специфических последовательностей ДНК (если предоставлены подходящие праймеры ПЦР), сопровождающихся анализом кривой плавления высокого разрешения для детекции вариантов последовательности у нескольких образцов.

Отдельный 25 мМ MgCl₂ исходный стоковый раствор, поставляемый с набором реагентов, позволяет с легкостью оптимизировать концентрацию Mg²⁺.

В принципе, набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 может быть использован для специфической амплификации любой ДНК- или кДНК-мишеней. Однако, Вам будет необходимо адаптировать каждый амплификационный протокол к условиям реакции системы LightCycler® 480 и создавать индивидуальные ПЦР-праймеры для каждой мишени. Прилагаемый краситель для анализа плавления высокого разрешения LightCycler® 480 дает возможность проводить детекцию двухцепочечной ДНК путем флуоресценции, мониторинга образования ампликонов во время цикла ПЦР, а также при помощи анализа кривой плавления, используя высокоразрешающие способности прибора LightCycler® 480 по получению данных. Образцы с отклонениями в последовательностях ДНК определяются путем выявления несоответствий формы кривой плавления. Этот способ особенно подходит для распознавания гетерозиготных, формирующих гетеродуплексы с мисматчем, и монозиготных вариантов ДНК, благодаря различному характеру их поведения при плавлении.

⚠ Для получения оптимальных результатов следует использовать набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 только совместно с многолуночными планшетами LightCycler® 480.

⚠ Чем короче ампликон, тем лучше происходит дифференциация образцов, имеющих отклонения в последовательностях. Наилучшие результаты достигаются при длине ампликона до 300 н.п. Если длина ампликона превышает 500 н.п., чувствительность детекции отклонений снизится.

⚠ Функциональность набора, описанного в данной инструкции, может быть гарантирована только при условии его использования совместно с ПЦР-анализатором LightCycler® 480.

③ Набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 совместим с консервантами (напр. ДМСО), усиливающими амплификацию GC-богатых последовательностей.

③ Для получения более подробной информации и общих рекомендаций, см. «Дополнительную информацию о продукте» на стр. 14 или руководство к программному обеспечению для сканирования генов (LightCycler® 480 Gene Scanning Software).

**Длительность
проведения анализа**

Варьируется в зависимости от количества циклов и продолжительности отжига. Например, если программой задано 45 циклов, а продолжительность отжига – 10 секунд, тогда время проведения сканирования генов в ПЦР на приборе LightCycler® 480 будет составлять 75 минут, включая 10-минутный преинкубационный период и 15-минутный период на плавление высокого разрешения.

2. Как использовать продукт

2.1 Перед началом работы.

Исходный материал

- Используйте любую ДНК-матрицу (напр. геномную ДНК или кДНК), пригодную для проведения ПЦР по степени гомогенности, концентрированности и не содержащую ингибиторов ПЦР.
- Используйте 5 - 30 нг геномной ДНК на 20 мкл реакции. Используйте одинаковое количество ДНК-матрицы в каждой реакции.

⚠ Проводите одну и ту же процедуру экстракции для подготовки всех образцов, подлежащих анализу с помощью плавления высокого разрешения. Это поможет исключить все мельчайшие различия, которые могут быть проявлены реактивными компонентами в элюирующем буферном растворе различных процедур экстракции. Для воспроизводимого выделения нуклеиновых кислот используйте:

- прибор MagNa Pure LC или прибор MagNa Pure Compact и строго стационарный набор реагентов (для автоматического выделения) или
 - набор для выделения нуклеиновых кислот High Pure (для ручного выделения).
- Для получения более подробной информации см. каталог Roche Applied Science или интернет-сайт: www.roche-applied-science.com

⚠ Перерастворите все образцы ДНК в том же буферном растворе, измерьте их количество при помощи спектрофотометрии и отрегулируйте его до той же концентрации при помощи буферного раствора для ресуспензирования.

⚠ Убедитесь, что получающиеся амплификационные графики ПЦР имеют значения СР, не превышающие 30 циклов, в противном случае имеется основание полагать, что

- количество ДНК-матрицы недостаточно;
- использована ДНК-матрица ненадлежащего качества (напр. деградация ДНК или наличие элементов, задерживающих реакцию ПЦР);
- имеются неспецифические амплификационные артефакты.

Следует отметить, что, по сравнению с другими ПЦР-реагентами, при использовании набора реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 в некоторых случаях значения СР могут быть на несколько циклов выше, вследствие того, что он оптимизирован для проведения высоко специфичной амплификации, что для экспериментов по сканированию гена имеет гораздо большее значение, чем чувствительность.

Праймеры

- Для проведения анализа плавления высокого разрешения, специфичная амплификация является обязательным условием. Следовательно, концентрация праймеров не должна быть очень высокой. Подходящая концентрация ПЦР-праймеров колеблется от 0,1 до 0,3 мкл (конечная концентрация в ПЦР). Рекомендуемая концентрация для начала анализа – по 0,2 мкл каждой.
- Сконструируйте ПЦР-праймеры с температурой нагрева при отжиге 60°C и создайте короткие ампликоны (100-250 н.п.). Для конструирования праймеров используйте пакеты программного обеспечения, такие как Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) или LightCycler® 480 Probe Design Software 2.0.

⚠ Используйте только те праймеры, которые прошли очистку ВЭЖХ.

⑨ Оптимальной концентрацией праймеров является наименьшая концентрация, при которой получается высокий выход продукта с низким СР и соответствующей для концентрации данной мишени флуоресцентной динамикой.

MgCl₂

Так как специфичная амплификация является обязательной для проведения анализа плавления высокого разрешения, необходимо определить оптимальную концентрацию MgCl₂ для каждой новой пары праймеров. Для этого проведите реакцию с серией растворов различного разбавления MgCl₂ (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 и 3.5 мМ конечной концентрации в ПЦР) и проанализируйте продукты ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле. Наименьшее значение концентрации MgCl₂ при наибольшем выходе мишени ПЦР и отсутствии неспецифичных побочных продуктов является оптимальным для данного исследования.

В таблице, приведенной ниже, указан объем стокового раствора MgCl₂ (виал 2, синий колпачок), который необходимо добавить на 20 мкл реакции (конечный объем ПЦР) для достижения желаемой конечной концентрации MgCl₂.

Для достижения конечной концентрации Mg ²⁺ (мМ):	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Добавьте следующее количество 25 мМ основного раствора MgCl ₂ (мкл)	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8

Если ни одна из концентраций серий растворов различного разбавления MgCl₂ не приводят к получению достаточной амплификации или характеризуются присутствием побочных продуктов, оптимизируйте температуру нагревания при отжиге в протоколе ПЦР, регулируя увеличение или уменьшение температуры соответствующим образом.

Отрицательный контроль

Всегда проводите отрицательный контроль образцов. Для подготовки проведения отрицательного контроля, замените ДНК-матрицу водой, со степенью очистки, подходящей для ПЦР (виал 3, бесцветный колпачок).

2.2. Последовательность операций

Протокол прибора LightCycler® 480

Нижеописанная процедура оптимизирована для ее применения в приборе LightCycler® 480.

⚠ Если тип прибора не указан, "LightCycler® 480 Instrument" используется для обозначения Приборов LightCycler® 480 I и II.

⚠ Запрограммируйте прибор LightCycler® 480 до того, как приступите к приготовлению реакционных растворов.

Протокол прибора LightCycler® 480, который использует набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480, содержит следующие программы:

- **Пре-инкубация** для активации FastStart Taq ДНК-полимеразы и денатурации ДНК-матрицы
- **Аmplification** ДНК-мишени
- **Плавнение** ампликона с получением данных высокого разрешения
- **Охлаждение** ротора и термальной камеры

🔍 Для получения более подробной информации о том, как запрограммировать экспериментальный протокол см. руководство пользователя прибора LightCycler® 480.

Данная таблица содержит рекомендуемые параметры ПЦР для начального запуска ПЦР-анализатора LightCycler® 480 для начала проведения исследования по сканированию гена с использованием набора реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480.

Настройки

Формат детекции	Тип блока	Объем реакции ¹⁾
SYBR Green I	"96" или "384"	'10 – 100 мкл' или '3 – 20 мкл'

Программы

Название программы	Циклы	Режим Анализа
Пре-инкубация	1	Нет
Аmplification	45 ²⁾	Количественный анализ
Плавнение высокого разрешения	1	Кривая плавления
Охлаждение	1	Нет

Целевые температуры

Целевая температура (°C)	Режим сбора данных	Выдержка (чч:мм:сс)	Скорость изменения температуры (°C/сек) (96 лунок/ 384 лунки)	Измерения (в 1°C)
Пре-инкубация				
95	Нет	00:10:00	4,4 / 4,8	-
Аmplification				
95	Нет	00:00:10	4,4 / 4,8	-
зависит от праймеров ³⁾	Нет	00:00:15	2,2 / 2,5	-
72	Един.измерение	00:00:10 - 00:00:25 ⁴⁾	4,4 / 4,8	-

Плавнение высокого разрешения

95	Нет	00:01:00	4,4 / 4,8	-
40 ⁵⁾	Нет	00:01:00	2,2 / 2,5	-
65 ⁶⁾	Нет	00:00:01	1/1	-
95 ⁶⁾	Непрерывные измерения	-	-	25

Охлаждение

40	Нет	00:00:10	2,2/2,5	-
----	-----	----------	---------	---

Если Вы не знаете точных температур плавления ваших праймеров ПЦР, рекомендуется использовать протокол touchdown ПЦР, покрывающий разброс температур отжига от 65 до 53°C. Измените целевые температуры в программе амплификации в соответствии с таблицей, приведенной ниже:

Целевая температура (°C)	Режим сбора данных	Выдержка (чч:мм:С)	Скорость изменения температуры (°C/сек) (96 лунок/ 384 лунки)	Целевая температура (°C)	P-p шага (°C)	Задержка шага (циклы)
--------------------------	--------------------	--------------------	---	--------------------------	---------------	-----------------------

Амплификация

95	Нет	00:00:10	4,4 / 4,8	-		
зависит от праймера в ³⁾	Нет	00:00:15	2,2 / 2,5	53	0.5	1
72	Единичные измерения	00:00:10 - 00:00:25 ⁴⁾	4,4 / 4,8	-		

¹⁾ Рекомендуемый объем реакции для обоих типов многолунковых планшетов (с 96 или с 384 лунками) - 10 - 20 мкл.

²⁾ 45 циклов достаточно для большинства экспериментов. Если анализ оптимизирован и имеет чрезмерно крутую кривую плавления и ранние точки пересечения (даже при низких концентрациях мишеней), 40 циклов должно быть достаточно. Уменьшение количества циклов уменьшит длительность проведения анализа!

³⁾ Температура отжига – это параметр, имеющий наибольшее влияние на специфичность и корректность амплификации. Для начальных экспериментов установите целевую температуру (т.е. температуру отжига праймеров) на 2 °C ниже просчитанной T_m праймера. Количество специфичного продукта, наличие / отсутствие нежелательного побочного продукта, а также наличие / отсутствие димерного продукта укажут на наилучший способ оптимизации данного параметра. Если при проведении реакции вырабатывается нежелательный продукт, увеличьте температуру отжига. Если амплификация некорректна, уменьшите температуру отжига и / или увеличьте длительность отжига.

⁴⁾ Вычислите точное время элонгации, необходимое для вашей специфичной мишени, разделив длину ампликона на 25 (напр.: для ампликона длиной 500 н.п. необходимое время элонгации составляет 20 сек)

⁵⁾ Данная температура предварительной выдержки обеспечивает повторное сцепление всех продуктов ПЦР, а также образование гетеродуплекса.

⁶⁾ Реальные условия плавления зависят от ампликона. Для начальных экспериментов установите широкий интервал плавления, напр. от 60 до 95°C. Как только Вы определите, при какой температуре продукт начинает плавиться, уменьшите интервал плавления до 25 °C. Убедитесь, что программа плавления начинает работать, как минимум, за 10°C до, и заканчивается, как минимум, на 10°C после достижения ожидаемой T_m.

Подготовка ПЦР-смеси

Для приготовления одной стандартной 20 мкл реакции следуйте последовательности операций, описанной ниже.



Не прикасайтесь к поверхности многолуночного планшета LightCycler® 480 во время работы с ним.

- 1 • Разморозьте растворы и, чтобы полностью обеспечить восстановление всех компонентов, немного прокрутите виалы в микроцентрифуге прежде, чем открыть их.
• Аккуратно смешайте пипетированием и оставьте на льду.
- 2 Приготовьте 20-и кратный раствор ПЦР-праймеров.
- 3 В 1,5 мл реакционной пробирке, помещенной в лед, приготовьте ПЦР-смесь для проведения одной 20 мкл реакции, добавляя следующие компоненты, в указанной ниже последовательности:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
Мастер Микс, 2 х (виал 1, зеленый колпачок)	10.0 мкл	1 х
Смесь праймеров, 2 х конц. [4 мкМ]	1.0 мкл	0.2 мкМ (каждой праймеры)
MgCl ₂ , 25 мМ (виал 1, синий колпачок) ¹⁾	X мкл	
Вода, со степенью очистки, подходящей для ПЦР (виал 3, бесцветный колпачок)	15,0 мкл	-
Общий объем	15 мкл	

¹⁾ Необходимый объем основного раствора MgCl₂ специфичен для каждого отдельного анализа. См. "MgCl₂" на стр. 5.

Чтобы приготовить ПЦР-смесь для проведения более одной реакции, увеличьте количества, указанные в колонке "Объем" на количество проводимых реакций + одну дополнительную реакцию.

- 4 • Аккуратно смешайте пипетированием. Не вортируйте.
• Добавьте по 15 мкл ПЦР-смеси в каждую лунку многолуночного планшета LightCycler® 480
• Добавьте 5 мкл ДНК-матрицы.
• Герметично закройте многолуночный планшет при помощи запечатывающей пленки LightCycler® 480.
- 5 • Поместите многолуночный планшет в центрифугу и уравновесьте его соответствующим противовесом (напр. другим многолуночным планшетом).
• Центрифугируйте в течение 2-х минут при 1500 x g в стандартной центрифуге с поворотной лопаткой с ротором для многолуночных планшето с соответствующими адаптерами.
- 6 Поместите многолуночный планшет в прибор LightCycler® 480.
- 7 Запустите программу ПЦР, описанную выше.
 Если используются объемы реакции, отличные от 20 мкл, убедитесь, что Вы правильно отрегулировали значение объема реакции в текущем протоколе. Для начала мы рекомендуем использовать те же периоды выдержки, как и для реакции объемом 20 мкл.

2.3. Смежные процедуры**Предотвращение
контаминации при
переносе
исследуемого
материала**

Урацил-ДНК-гликозилаза (UNG) подходит для предотвращения перекрестной контаминации при проведении ПЦР. Данный метод заключается в добавлении дезоксиуридина трифосфата (дУТФ) в продукты амплификации, а также в предварительной обработке всех последующих смесей ПЦР при помощи UNG. Если подобные ампликоны присутствуют в ПЦР-смеси, UNG расщепляет ДНК в том месте, где присутствуют дезоксиуридиновые остатки. Впоследствии, получающиеся в результате абазические места гидролизуются под действием высоких температур во время этапа первоначальной денатурации и не могут служить матрицами ПЦР. Нормальная ДНК содержит тимидин, но не уридин, поэтому данная процедура не оказывает на нее влияния.

Чтобы избежать перекрестную контаминацию при использовании Урацил-ДНК-гликозилазы LightCycler®, следуйте приведенным ниже указаниям:

- ❶ На 20 мкл конечного объема реакции, добавьте в смесь ПЦР 0,5 мкл Урацил-ДНК-гликозилазы LightCycler® (1 ед.).
- ❷ Добавьте ДНК-матрицу и выдержите реакционную смесь в течение 10 минут при температуре 40 °С для разрушения всех контаминационных матриц.
- ❸ Инактивируйте термолабильную UNG путем осуществления преинкубационного этапа при 95°С в течение 10 минут.

3. Результаты

Результаты, описанные ниже, были получены при использовании набора реагентов для анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 вместе с праймерами и стандартными ДНК из контрольного набора LightCycler® 480*. Концентрация праймеров была сокращена до половины от той, что указана в листке-вкладыше к анализу при помощи использования зондов, концентрация $MgCl_2$ составляла 1,5 мМ.

Стандартные ДНК представляют собой образцы различных генотипов относительно однонуклеотидного полиморфизма (SNP) С/Т в гене *CyP2C9*.

После проведения ПЦР ампликоны были проанализированы согласно кривой плавления высокого разрешения, а данные были обработаны с помощью программного обеспечения по сканированию генов LightCycler® 480.

В образцы ДНК была введена 1/7 количества стандартного ДНК дикого типа для усиления дифференциации различных гомозигот (дикий тип и мутантный). В зависимости от отклонений последовательности, иногда бывает тяжело дифференцировать различные гомозиготы по форме кривой плавления. После ввода малых количеств (1/10 – 1/5) ДНК дикого типа в образцы, становится легче отличить гомозиготных мутантов от дикого типа, и, в то же время, от образцов гетерозиготных мутантов.

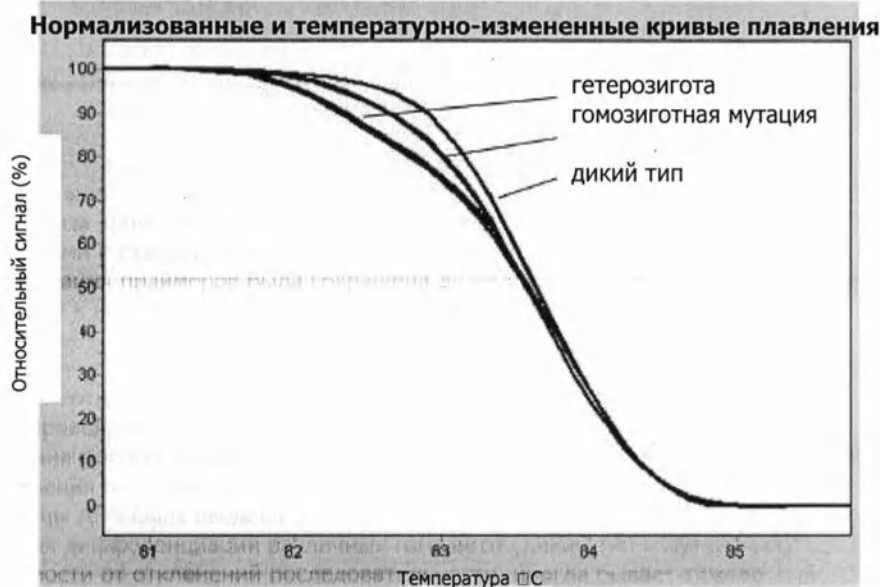


Рис. 1: Нормализованные, температурно-измененные кривые плавления, полученные при анализе ампликона *CyP2C2*, имеющего отклонение в последовательности, оцененные при помощи программного обеспечения по сканированию генов LightCycler® 480. Отклонения в последовательности определяются различием форм кривых плавления.

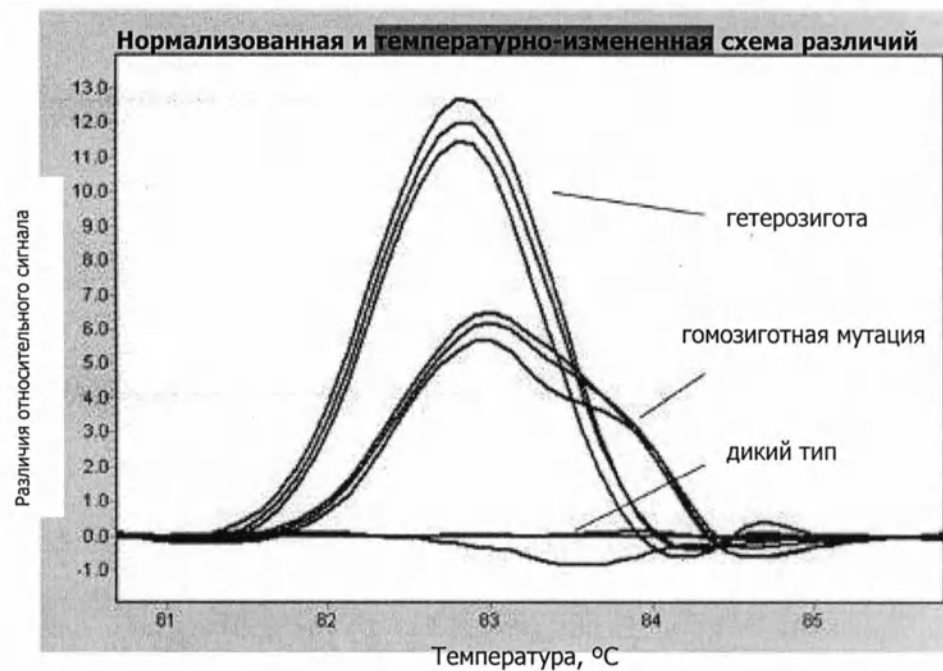


Рис.2: Схемы выявленных различий, полученных при анализе ампликона Cyp2C2, имеющего отклонение в последовательности, оцененные при помощи программного обеспечения по сканированию гена LightCycler® 480. Образцы сгруппированы в зависимости от формы кривой относительно их последовательности.

4. Выявление ошибок и их исправление

	Выявление ошибок и их исправление	
	Возможная причина	Рекомендации
Формы кривых на графике различий не имеют видимых отклонений, нет оснований для группировки	Недостаточная концентрация или неподходящее качество образцов ДНК	• Наименьшее повышение сигнала во время амплификации должно составлять не менее 60% от наибольшего. Уровни сигнала в начале кривой плавления должны быть похожи настолько, насколько это возможно. • Убедитесь, что кривые амплификации отражают значения $CP < 30$ циклов, а заданный промежуток для всех образцов составляет не более 3 циклов.
	Стандартные настройки слайдеров на экране Нормализации программного обеспечения по сканированию генов не подходят.	Настраивайте слайдеры непосредственно перед и после необходимой области плавления. Исключите наличие дополнительных плавлений побочных продуктов.
	Длина ампликона слишком велика.	Наиболее явные различия в отклонениях последовательностей дают ампликоны длиной до 300 н.п. При использовании ампликонов длиной более 600 н.п. отклонения последовательностей могут быть трудно различимы, вследствие ограниченного разрешения.
	Все ампликоны, используемые для проведения эксперимента, имеют идентичные последовательности.	Нет ошибки.
Кривые амплификации достигают фазы плато до окончания циклирования. Логарифмическая фаза амплификации начинается только после окончания программы цикла.	Слишком большое изначальное количество нуклеиновой кислоты.	Остановите программу циклирования нажатием клавиши "End Program" (конец циклирования). Программа кривой плавления будет продолжена.
	Слишком большое количество циклов.	Уменьшите количество циклов в программе циклирования.
Амплификация не определяется.	Недостаточное количество циклов.	• Если цикл еще не закончен, нажмите клавишу «Add 10 Cycle» (Добавить 10 циклов) для увеличения количества циклов. • Увеличьте количество циклов в программе циклирования. • Используйте больше первоначального материала. • Оптимизируйте условия ПЦР (конструирование праймеров, протокол).
	Для отображения амплификации на дисплее было использовано неверное сочетание фильтров.	Выберите сочетание фильтров, подходящее для проведения вашего исследования на дисплее анализа и начните снова.
	Был выбран неверный формат детекции для экспериментального протокола.	Выберите формат детекции, подходящий для проведения Вашего исследования и начните снова. А именно SYBR Green I.
	Плохо очищенный образец ингибирует реакцию.	• Попробуйте разбавить Ваш образец 1:10. • Очистите нуклеиновую кислоту от Вашего исходного материала, чтобы убедиться в отсутствии веществ, ингибирующих реакцию.
	FastStart Taq ДНК-полимераза не достаточно активизирована.	• Убедитесь, что начальный преинкубационный этап (95°C на 10 минут) включен в протокол ПЦР. • Убедитесь, что время денатурации при амплификации составляет как минимум 10 секунд.
	Ошибки пипетирования или пропущенные реагенты.	Проверьте отсутствующие или испаренные реагенты.

**Флуоресценция
слишком
неустойчива или
слишком мала.**

**Образец
отрицательного
контроля дает
возрастающий
сигнал во время
ПЦР.**

Возможная причина	Рекомендации
Сложная матрица, напр. необычная CG-богатая последовательность.	• Оптимизируйте последовательности праймеров. • Оптимизируйте температуры и длительность амплификационных циклов. • Повторите процедуру ПЦР, добавляя увеличивающиеся количества ДМСО (используйте до 10% ДМСО в реакции).
Какие-то из реагентов все еще находятся в верхней части лунки или в лунке образовался пузырек воздуха.	Повторите операцию центрифугирования, установив при этом такой временной режим (напр. 2 минуты при 1500 x g), чтобы все реагенты успели достичь дна лунки и/или чтобы все пузырьки воздуха исчезли.
Низкая концентрация или плохое состояние красителя в реакционном растворе, вследствие неправильного хранения Мастер Микса.	• Не подвергайте Мастер Микс и готовую ПЦР-смесь действию солнечного света. • Храните реагент при температуре от -15 до -25 °C и не допускайте повторного замораживания и размораживания.
Низкая эффективность ПЦР (не оптимизированные реакционные условия)	• Проверьте концентрацию праймеров и MgCl₂. • Оптимизируйте протокол.
Реагенты загрязнены.	• Используйте несодержащие загрязнений реагенты. • Предпримите меры по предотвращению перекрестной контаминации с помощью UNG.

5. Дополнительная информация о продукте

Как действует продукт

Набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 – готовая к использованию реакционная смесь, разработанная для выявления ДНК, отличающихся в последовательности от других образцов ДНК. В ее состав входит FastStart Taq ДНК-полимераза, обеспечивающая «горячий старт» ПЦР-реакции, сводя к минимуму образование неспецифических продуктов амплификации (1, 2, 3, 4), и краситель для анализа плавления высокого разрешения LightCycler® 480, служащий для отслеживания образования и денатурации двухцепочечной ДНК. FastStart Taq ДНК-полимераза представляет собой химически измененную форму термоустойчивой рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы, неактивной при температурном режиме до 75°C. Фермент активен только при высоких температурах, когда праймеры не связываются неспецифично. Фермент активируется (удалением блокирующих групп) во время одиночного этапа пре-инкубации (95°C, 5 – 10 мин.) до начала процедуры цикла.

Краситель для анализа плавления высокого разрешения LightCycler® 480 – это новый флуоресцентный краситель, который позволяет осуществлять детекцию отклонений последовательности по различиям формы кривой плавления, особенно если образец – гетерозигота по определенной мутации. Это свойство не характерно для других красителей, которые обычно используются при проведении ПЦР-реакций в режиме реального времени (напр. SYBR Green I или этидий бромид). Краситель для анализа плавления высокого разрешения LightCycler® 480 не ингибирует ферменты амплификации. Таким образом, высокие концентрации красителя не вредят ПЦР. Эти высокие концентрации полностью насыщают двухцепочечную ДНК в образце. Двухцепочечная ДНК остается насыщенной красителем в течение последующих экспериментов по плавлению. Под действием этих условий, даже единичные нуклеотидные замены приводят к незначительным, но достаточно различимым изменениям кривой плавления.

Принцип проведения теста

Технологии «сканирования генов» или «сканирования мутаций» позволяют производить обнаружение отклонений в последовательностях ампликонов генов-мишеней. Технология основывается на плавлении высокого разрешения в закрытой пробирке после проведения ПЦР и дает возможность исследователям в области геномики анализировать генетические отклонения в ампликонах перед или вместо секвенирования. Плавление высокого разрешения обеспечивает высокую специфичность, чувствительность и удобство при заметно большей скорости и меньших затратах, чем другие существующие методы (напр. гелевый). В исследовании по сканированию гена при помощи анализатора LightCycler® 480 образец ДНК сначала амплифицируется посредством ПЦР анализа в реальном времени в присутствии красителя для анализа плавления высокого разрешения LightCycler® 480. После завершения ПЦР анализа, последующие исследования по плавлению могут проводиться на том же приборе LightCycler® 480 и анализироваться с помощью программного обеспечения для сканирования генов LightCycler® 480 с целью идентификации вариантов последовательности. Таким образом, все исследование может проводиться при помощи одного прибора LightCycler® 480, без открывания реакционных пробирок, а также без выполнения дополнительных этапов, требующих ручных операций, после проведения ПЦР.

Ссылки

1. Chou, Q et al. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nuc. Acids Res.* 20, 1717-1723.
2. Kellogg, DE et al. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 16, 1134-1137.
3. Birch, DE (1996). Simplified hot start PCR. *Nature* 381, 445-446.
4. PCR Applications Manual, Roche Diagnostics (2006). 3rd edition, 66-73.
5. Wittwer, CT et al. (2003). High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clini. Chem.* 49, 853-860
6. Herrmann, MG et al (2006). Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clin. Chem.* 53, 494-503.

Контроль качества

Набор реагентов для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения LightCycler® 480 функционально протестирован с использованием ПЦР-анализатора в режиме реального времени LightCycler® 480.

6. Дополнительная информация

6.1 Условные обозначения.

6.1.1 Условные обозначения в тексте

Для того, чтобы информация была последовательной и легко запоминающейся, в данной инструкции используются следующие условные обозначения:

Условные обозначения в тексте	Значение
Нумерованные инструкции, маркированные ①, ② и т.д.	Этапы проведения процесса, которые обычно выполняются в указанной последовательности
Нумерованные инструкции, маркированные 1, 2 и т.д.	Этапы проведения процесса, которые должны выполняться в указанной последовательности
Звездочка *	Обозначает продукт, поставляемый компанией Roche Applied Science

6.1.2 Символы

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

Значение символа	
	Информационное Примечание: Дополнительная информация о текущей теме или процедуре.
	Важное Примечание: Информация, необходимая для успешного осуществления процесса или использования продукта.

6.2 Изменения, внесенные в данное издание

- Дополнено информацией о проборе LightCycler®-II.

6.3 Как сделать заказ

Roche Applied Science предлагает большой выбор реактивов и систем для исследований в сфере науки о жизни. Полный перечень продукции и руководств по применению Вы можете получить на нашем сайте

www.roche-applied-science.com,

и профессиональных сайтах (Special Interest Sites), в том числе:

- Системы проведения ПЦР в режиме реального времени (система LightCycler® карусельного типа, система LightCycler® 480, и универсальная библиотека зондов): www.lightcycler.com

- Автоматизированная подготовка образцов (прибор MagNA Lyser, компактная система MagNA Pure Compact и система MagNA Pure LC): www.magnapure.com

- Количественная ПЦР в реальном времени с зондами UPL:

<http://www.universalprobelibrary.com>

Приборы

Программное обеспечение

Аксессуары

Продукт	Комплектация	Кат. No.
Прибор LightCycler® 480 II, 96 лунок	1 прибор с блоком управления и аксессуары	05 015 278 001
Прибор LightCycler® 480 II, 384 лунки	1 прибор с блоком управления и аксессуары	05 015 243 001
Программное обеспечение LightCycler® 480, версия 1.5	1 комплект программного обеспечения	04 994 884 001
Интерфейс ЛИС (LightCycler® 480 LIMS Interface Module)	1 комплект программного обеспечения	05 066 310 001
Программное обеспечение для сканирования генов (LightCycler® 480 Gene Scanning Software)	1 комплект программного обеспечения	05 103 90 8001
Программное обеспечение для анализа нескольких планшетов (LightCycler® 480 MultiPlate Analysis SW 1.0)	1 комплект программного обеспечения	05 075 122 001
Термоблок для 96-луночного планшета (LightCycler 480 II Block Kit, 96)	блок термоциклера для 96-луночных планшетов, с крышкой для блока, боксом для хранения и приспособлением для загрузки	05 015 219 001
Термоблок для 384-луночного планшета (LightCycler 480 II Block Kit, 384)	блок термоциклера для 384-луночных планшетов с крышкой для блока, боксом для хранения и приспособлением для загрузки	05 015 197 001
96-луночный планшет LightCycler® 480	50 планшетов и 50 единиц герметизирующей фольги	04 729 692 001
384-луночный планшет LightCycler® 480	50 планшетов и 50 единиц герметизирующей фольги	04 729 749 001
96-луночный планшет LightCycler® 480, прозрачный	50 планшетов и 50 единиц герметизирующей фольги	05 102 413 001
384-луночный планшет LightCycler® 480, прозрачный	50 планшетов и 50 единиц герметизирующей фольги	05 102 430 001
Запечатывающая пленка LightCycler® 480	1 x 50 фольги	04 729 757 001
Аппликатор для запечатывающей пленки LightCycler® 480		04 706 170 001

Дополнительная Информация о Продукте

	Продукт	Комплектация	Кат. No.
Реагенты ПЦР	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 × 1 мл (5 × 100 реакций, 20 мкл каждый) 10 × 5 мл (10 × 500 реакций, 20 мкл каждый)	04 707 516 001 04 887 352 001
	LightCycler® 480 Probes Master	1 набор (5 × 100 реакций, 20 мкл каждый) 1 набор (10 × 100 реакций, 20 мкл каждый) 1 набор (1 × 5000 реакций, 20 мкл каждый)	04 707 494 001 04887 301 001 04 902 343 001
	LightCycler® Genotyping Master	1 набор (5 × 100 реакций, 20 мкл каждый)	04 707 524 001
	LightCycler® RNA Master Hydrolysis Probe	1 набор (5 × 100 реакций)	04 991 885 001
	Универсальная библиотека зондов, человеческая	Библиотека из 90 ранее утвержденных зондов для детекции	04 683 633 001
Универсальная библиотека зондов	Универсальная библиотека зондов, мышиная	Библиотека из 90 ранее утвержденных зондов для детекции	04 683 641 001
	Универсальная библиотека зондов, крысиная	Библиотека из 90 ранее утвержденных зондов для детекции	04 683 641 001
	Универсальная расширенная библиотека зондов	Библиотека из 75 ранее утвержденных зондов для детекции (зонды с #91 по #165)	04 869 877 001
	Урацил-ДНК-гликозилаза	100 ед. (50 мкл)	03 539 806 001
Вспомогательные наборы и реактивы	LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set	1 комплект (96 реакций)	03 261 883 001
	Transcriptor Reverse Transcriptase	250 ед. 500 ед. 2000 ед.	03 531 317 001 03 531 295 001 03 531 287 001
	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 набор	04 379 012 001
	First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	1 набор	11 483 188 001

6.4 Лицензия на ответственное использование

Закупочная цена данного продукта включает стоимость ограниченной, не подлежащей передаче лицензии в соответствии с патентами США, № 5,994,056 и 6,171,785 и соответствующими патентными притязаниями за пределами Соединенных Штатов, принадлежащими «Roche Molecular Systems, Inc.» или «F. Hoffmann-La Roche Ltd» ("Roche"), а также в соответствии с патентом США, № 6,569,627 и соответствующими патентными притязаниями за пределами Соединенных Штатов, лицензированными компанией Idaho Technology Inc, на использование только данного объема продукции в практике процесса окраски связанных двухцепочечных ДНК в рамках данного патента, только для внутренних исследований и разработок покупателя. Данный продукт также является лицензированным набором для связывания и окрашивания для использования с сервисными сублицензиями от компании «Applied Biosystems». Таким образом, никакие права в соответствии с любыми другими патентными претензиями (например, претензии на приборы и системы в Патентах США, № 6,814,934) и никакие права на выполнение коммерческих услуг любого вида, в том числе без ограничения, право на передачу информации о результатах деятельности покупателя за определенную плату или в других коммерческих целях, не даются в прямой форме, косвенно или путем процессуального отвода. Данный продукт предназначен только для исследовательских целей. Использование в диагностических целях требует получения отдельной лицензии от компании «Roche».

Более подробную информацию по получению лицензий для выполнения ПЦР-анализов в режиме реального времени можно получить, обратившись к директору по лицензированию, компания «Applied Biosystems», по следующему адресу: 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Данный продукт частично попадает под действие патента Соединенных Штатов № 5,871,908 или соответствующих патентных притязаний за пределами Соединенных Штатов совместно лицензированных компанией Evotec OAI AG. Закупочная цена включает стоимость лицензии на осуществление практики методов, попадающих под действие лицензии Соединенных Штатов № 5,871, 908 на использование данного продукта. При этом, в закупочную цену не включено права приобретателя лицензии на

- (i) коммерческое изготовление или продажу реагентов и/или наборов, а также
- (ii) покупку или использование реагентов и/или наборов, предоставленных третьей стороной

используемые вместе с данным продуктом или любым другим термоциклером для осуществления практики методов, попадающих под действие патента Соединенных Штатов № 5,871,908 или любых других эквивалентных патентов других стран.

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE, MAGNA LYSER и HIGH PURE являются торговыми марками «Roche».

Другие торговые марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

**Контактная
информация и
поддержка**

Если у Вас возникают вопросы или проблемы с данным или другим продуктом «Roche Applied Science» (RAS), просим Вас связаться с подразделением технической поддержки. Наши научные сотрудники обязуются предоставить скорую и эффективную помощь.

Мы также хотели бы, чтобы Вы обращались к нам с предложениями об улучшении свойств продукции RAS или о новых или специализированных методах использования нашей продукции. Такая информация от потребителя бесценна для RAS и исследователей во всем мире.

Чтобы задать вопросы, решить проблемы, предложить какие-либо улучшения или сообщить о новых вариантах использования, просим вас посетить наш **сайт технической поддержки**:

www.roche-applied-science.com/support

Для того, чтобы позвонить, написать, отправить факс или электронное сообщение, посетите домашнюю страницу компании «Roche Applied Science», www.roche-applied-science.com, и выберите вашу страну.

На сайте отразятся контактные данные в вашей стране.

На домашней странице «Roche Applied Science» выберите **«Печатные материалы» (Printed Materials)** и вы найдете:

- развернутые технические руководства
- часто задаваемые вопросы по лаборатории: протоколы и ссылки по исследованиям науки о жизни
- наш ежеквартальный информационный бюллетень «Biochemica»
- справочный листок по безопасности материалов
- вкладыши и инструкции по использованию продукции и запросить жесткие копии печатных материалов.

0208.05039177 001



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»



М. Петрович

«02» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами (LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes)

Для общего лабораторного использования. Не предназначен
для диагностических процедур. ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ТОЛЬКО В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.



Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами

LightCycler[®] 480 RNA Master Hydrolysis Probes

Издание февраль 2008

Простая в использовании реакционная смесь (2,7х конц.) для проведения
одношагового ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием
системы LightCycler[®] 480

Кат.№ 04 991 885 001

Набор для 5 × 100 реакций (20 мкл)

Набор хранить при температуре от - 15 до - 25°C

Содержание

1. Как действует продукт.....	3
Количество тестов.....	3
Содержимое набора.....	3
Условия хранения и стабильность.....	3
Дополнительное оборудование и необходимые реактивы.....	4
Применение.....	4
2. Как использовать продукт	5
2.1 Перед началом работы.....	5
Исходный материал.....	5
Праймеры.....	5
Зонд.....	5
Активатор $Mn(OAc)_2$	5
Отрицательный контроль.....	6
Контроль контаминации ДНК.....	6
2.2 Последовательность операций.....	7
Системный протокол LightCycler® 480.....	7
Подготовка смеси для проведения ОТ-ПЦР.....	9
2.3 Смежные операции.....	10
Цветовая компенсация.....	10
Предотвращение перекрестной контаминации	10
3. Результаты.....	11
Количественный анализ.....	11
4. Выявление ошибок и их исправление.....	14
5. Дополнительная информация о продукте.....	16
Как действует продукт.....	16
Принцип проведения теста.....	17
Ссылки.....	17
Контроль качества.....	17
6. Дополнительная информация.....	18
6.1 Условные обозначения.....	18
6.1.1 Условные обозначения в тексте.....	18
6.1.2 Символы	18
6.2 Изменения, внесенные в данное издание.....	18
6.3 Как сделать заказ.....	19
6.4 Лицензия на ответственное использование.....	21
6.5 Торговые марки.....	21

1. Как действует продукт

Количество тестов

Набор предназначен для 5 × 100 реакций при объеме реакционной смеси 20 мкл на каждый тест

Содержание набора

Виял/Колпачок	Ярлык	Содержание / Назначение
1 красный	Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480, 2.7 ×	• 5 × 740 мкл в каждой • Содержит 7th ДНК-полимеразу, буферный раствор для реакции, MgCl₂, и смесь дНТФ (с дУТФ вместо дТТФ).
2 зеленый	Активатор, 50 мМ	• 650 мкл • Для корректировки концентрации Mn(OAc)₂
3 бесцветный	H ₂ O, со степенью очистки, подходящей для ПЦР	• 5 × 1 мл • Для корректировки окончательного объема реакционной смеси.
4 желтый	20 × Энхансер	• 500 мкл • Для улучшения амплификации сложных объектов (например, с высоким содержанием гуанина и цитозина)

Условия хранения и стабильность

- ⓘ Набор следует транспортировать в сухом льду.
- При соблюдении температурного режима хранения в пределах от -15 до -25°C, набор остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.
 - После вскрытия набора, его компоненты следует хранить в соответствии с условиями, указанными в таблице:

Виял	Ярлык	Условия хранения
1 красный	Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480, 2.7 ×	• Хранить при температуре от -15 до -25°C. • Запрещается повторное замораживание и размораживание!
2 зеленый	Активатор, 50 мМ	
3 бесцветный	H ₂ O, со степенью очистки, подходящей для ПЦР	• Хранить при температуре от -15 до -25°C.
4 желтый	20 × Энхансер	

Дополнительное оборудование и необходимые реактивы

В данном перечне указаны дополнительные реактивы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа с использованием набора реактивов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 и прибором LightCycler® 480:

- Прибор LightCycler® 480 *
- 384-луночный планшет LightCycler® 480* или 96-луночный планшет LightCycler® 480 *
- Стандартная центрифуга с поворотной лопаткой с ротором для многолуночных планшето с соответствующими адаптерами.
- Урацил-ДНК-гликозилаза, термолабильная * (опционально)

③ Для получения более подробной информации о том, как предотвратить перекрестную контаминацию, см. "Смежные операции" на странице 10.

- Не содержащие нуклеазы, аэрозоль-устойчивые наконечники для пипетки
- Пипетки с одноразовыми наконечниками и регулируемым объемом
- Стерильные реакционные пробирки для подготовки Мастер Миксов и растворов

** имеются в наличии в Roche Applied Science; для получения более детальной информации см. «Как сделать заказ»*

Применение

Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 используются для научных исследований. В сочетании с системой LightCycler® 480, данный набор использует протокол ОТ-ПЦР-анализа с «горячим стартом», что обеспечивает очень чувствительную детекцию количественный анализ определенных последовательностей РНК (при наличии соответствующих ПЦР-праймеров и гидролизных зондов).

Использование данного набора особенно актуально для сложных популяций РНК, так как повышенная инкубационная температура на этапе обратной транскрипции позволит избежать появления вторичных структур. Возможность «горячего старта» реакции позволяет минимизировать неспецифическое спаривание праймеров на начальном этапе реакции, поэтому общая чувствительность ОТ-ПЦР-анализа возрастает. Систему можно использовать с термолабильной ДНК-гликозилазой для предотвращения перекрестной контаминации при ПЦР-анализе.

В принципе, набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 можно использовать для амплификации и детекции любой РНК-мишени. Однако Вам будет необходимо адаптировать каждый протокол к условиям реакции системы LightCycler® 480 и создать специфичные праймеры и гидролизные зонды для каждой мишени. Общие рекомендации указаны в руководстве по пользователю прибора LightCycler® 480.

③ Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами LightCycler® 480 можно использовать для одновременной амплификации 3-4 мишеней РНК. Для получения наилучшего результата может возникнуть необходимость оптимизации каждого праймера и концентрации зонда, а также концентрации активатора [Mn(OAc)₂].

⚠ Размер ампликона не должен превышать 500 н.п. в длину. Для получения оптимальных результатов необходимо использовать продукт, длиной менее 100 н.п.

⚠ Функциональность набора, описанного в данной инструкции, может быть гарантирована только при условии его использования совместно с ПЦР-анализатором LightCycler® 480

2. Как использовать продукт

2.1 Перед началом работы

Исходный материал	Возможно использование любой РНК-матрицы (<i>например</i>, тотальная РНК или мРНК), подходящей для ПЦР-анализа на основании чистоты, концентрации и отсутствия ингибиторов ПЦР. Для воспроизводимого выделения нуклеиновой кислоты необходимо использовать: • прибор MagNa Pure LC или прибор MagNa Pure Compact и соответствующий набор реагентов (для автоматического выделения) или • набор для выделения нуклеиновых кислот High Pure (для ручного выделения). Более детальную информацию можно найти в каталогах «Roche Applied Science» или на веб-сайте: www.roche-applied-science.com
Праймеры	Ⓢ Использовать до 500 нг тотальной РНК или 100 нг мРНК. Более высокие концентрации могут привести к ингибированию реакции. Ⓢ Если концентрация РНК матрицы ниже 10 мкг/мл, рекомендуется добавить неспецифичный носитель РНК (<i>например</i>, ДНК MS2*). Во избежание потери РНК матрицы в связи с эффектом адсорбции, общая концентрация растворов РНК (матрица плюс носитель РНК) не должна быть ниже 10 мкг/мл.
Зонд	Конечная концентрация ПЦР-праймеров должна составлять 0,2 – 1 мкМ. Рекомендованная первоначальная концентрация составляет 0,5 мкМ. Необходимая концентрация гидролизного зонда варьируется от 0,05 до 0,25 мкМ (конечная концентрация в реакции). Рекомендованная первоначальная концентрация составляет 0,25 мкМ. Ⓢ Оптимальной является наиболее низкая концентрация зонда, способствующая получению наиболее низкого СР и достаточной флуоресценции мишени данной концентрации.
Активатор [Mn(OAc)₂]	⚠ Для того, чтобы расщепляемый гибридизационный комплекс сформировался правильно, гидролизный зонд должен быть отождествлен до мишени перед удлинением праймера. Температура плавления (<i>T_m</i>) зонда должна несколько превышать <i>T_m</i> ПЦР-праймеров, чтобы гибридизационный комплекс был стабильным. Более того, последовательность зонда должна учитывать мисматчи ДНК-матрицы, так как они также оказывают влияние на температуру отжига. Для обеспечения специфической и результативной амплификации необходимо использовать Mn(OAc)₂ (активатор, виал 2) в конечной концентрации 3,25 мМ. Титрование активатора не требуется, кроме случаев многократных анализов, когда оптимизация концентрации Mn(OAc)₂ необходима для достижения более качественных результатов. Ⓢ Добавление 0,1 мкл стокового раствора активатора в реакцию, проводимую в объеме 20 мкл, приводит к увеличению концентрации Mn(OAc)₂ до 0,25 мМ.

Как использовать продукт

Отрицательный контроль

Всегда необходимо проводить отрицательный контроль образцов. Для подготовки отрицательного контроля необходимо заменить РНК-матрицу на воду со степенью очистки, подходящей для ПЦР (виал 3, бесцветный колпачок).

Контроль контаминации ДНК

Для тестирования РНК-матрицы на контаминацию остаточной геномной ДНК, необходимо провести ПЦР в сочетании с набором реагентов LightCycler® 480 Probes Master. Так как в этой экспериментальной установке не предусмотрен этап обратной транскрипции, любой генерированный продукт ПЦР является свидетельством контаминации ДНК препарата РНК-матрицы.

2.2 Последовательность операций

Системный протокол LightCycler® 480

Нижеописанная процедура оптимизирована для ее применения в приборе LightCycler® 480.

⌚ Перед подготовкой реакционных смесей прибор LightCycler® 480 необходимо запрограммировать.

Протокол прибора LightCycler® 480, использующий набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480, содержит следующие программы:

- **Обратная транскрипция** РНК матрицы
- **Денатурация:** кДНК/РНК гибрид
- **Амплификация** кДНК
- **Охлаждение**

Для получения более детальной информации по программированию экспериментального протокола обращайтесь к руководству пользователя LightCycler® 480.

А) Протокол для использования с 96-луночным планшетом LightCycler® 480

В следующей таблице указаны параметры ПЦР, которые необходимо задать в системе LightCycler® 480 при использовании набора реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 с применением 96-луночного планшета LightCycler® 480.

Настройки				
Формат детекции		Тип блока	Объем реакции	
одноцветные гидролизные зонды или многоцветные гидролизные зонды		96	10 -100 мкл	
Программы				
Название программы		Циклы	Режим анализа	
Обратная транскрипция		1	Нет	
Денатурация		1	Нет	
Амплификация		45 ¹⁾	Количественный анализ	
Охлаждение		1	Нет	
Температурные мишени				
Мишень (°C)	Режим сбора данных	Выдержка (чч:мм:сс)	Скорость изменения температуры (°C/сек)	Измерения (за 1°C)
Обратная транскрипция				
63 ²⁾	Нет	00:03:00 ³⁾	4,4	-
Денатурация				
95	Нет	00:00:30	4,4	-
Амплификация				
95	Нет	00:00:10 - 00:00:15	4,4	-
60 ⁴⁾	Нет	00:00:30 - 00:00:60	2,2 ⁵⁾	-

72	Единичное измерение	00:00:01	4,4	-
Охлаждение				
40	Нет	00:00:10	2,2 ⁵⁾	
В) Протокол для использования с 384-луночным планшетом LightCycler® 480				
В следующей таблице указаны параметры ПЦР, которые необходимо задать в системе LightCycler® 480 при использовании набора реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 с применением 384-луночного планшета LightCycler® 480.				
Настройки				
Формат детекции		Тип блока	Объем реакции	
одноцветные гидролизные зонды или многоцветные гидролизные зонды		384	3 -20 мкл	
Программы				
Название программы		Циклы	Режим анализа	
Обратная транскрипция		1	Нет	
Денатурация		1	Нет	
Амплификация		45 ¹⁾	Количественный анализ	
Охлаждение		1	Нет	
Температурные мишени				
Мишень (°C)	Режим сбора данных	Выдержка (чч:мм:сс)	Скорость отслеживания графика нагрузки(°C/сек)	Измерения (за 1°C)
Обратная транскрипция				
63 ²⁾	Нет	00:03:00 ³⁾	4,8	
Денатурация				
95	Нет	00:03:30	4,8	
Амплификация				
95	Нет	00:00:10 - 00:00:15	4,8	
60 ⁴⁾	Нет	00:00:30 - 00:00:60	2,5 ⁵⁾	
72	Единичное измерение	00:00:01	4,8	
Охлаждение				
40	Нет	00:00:10	2,5 ⁵⁾	

¹⁾ Для большинства образцов достаточно 45 циклов. Если эксперимент оптимизирован и имеет крутые кривые амплификации и ранние точки пересечения (даже при низких концентрациях мишени), достаточно 40 циклов.

Снижение количества циклов уменьшит время, требуемое для исследования!

²⁾ Для проведения отжига рекомендуется температура 63°C. Для работы с некоторыми мишенями может потребоваться снижение температуры до 61°C.

³⁾ Для большинства мишеней периода инкубации в 3 минуты достаточно. Для некоторых мишеней время, требуемое для обратной транскрипции, может быть сокращено до 1 минуты.

**Подготовка
смеси для ОТ-
ПЦР**

⁴⁾ Для первоначальных экспериментов необходимо задать температуру мишени (т.е. температуру отжига праймеров) 60°C.

В зависимости от температуры плавления праймеров и гидролизных зондов может потребоваться дополнительная оптимизация.

⁵⁾ **Для пользователей программного обеспечения LightCycler® 480 Software 1.1:**

- При использовании 96-луночного планшета: если температура мишеней ниже 50°C, скорость изменения температуры необходимо задать на 1,5°C/сек!
- При использовании 384-луночного планшета: если температуры мишени ниже 50°C, скорость изменения температуры необходимо задать на 2,0°C/сек!

Для приготовления одной стандартной 20 мкл реакции следуйте последовательности операций, описанной ниже.



Не прикасайтесь к поверхности многолуночного планшета LightCycler® 480 во время работы с ним.

1

• Разморозьте растворы и, чтобы полностью обеспечить восстановление всех компонентов, немного прокрутите пробирки в микроцентрифуге прежде, чем открыть их.

• Аккуратно смешайте пипетированием и оставьте на льду.

2

Подготовьте раствор 10 ×, содержащий ПЦР-праймеры и гидролизные зонды.

3

В реакционной пробирке объемом 1,5 мл, находящейся на льду, подготовить смесь для ПЦР для реакции в объеме 20 мкл, добавив следующие компоненты в порядке, указанном ниже:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
Вода со степенью очистки, подходящей для ПЦР (виал 3, бесцветный колпачок)	7,3 мкл (6.3 мкл)	-
Праймер/зонд, 10× ¹⁾	2,0 мкл	0,5 мкМ/0,25 мкМ
Активатор	1,3 мкл	3,25 мМ Mg(OAc) ₂
LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes, 2.7× (виал 1, красный колпачок)	7,4 мкл	1×
Энхансер, 20× (по выбору)	(1,0 мкл)	1×
Общий объем	18 мкл	

Q

¹⁾ В связи с возможным взаимодействием праймеров во время хранения, перед началом реакции может возникнуть необходимость предварительно прогреть ПЦР-смесь праймера и зонда в течение 1 минуты при температуре 95°C. Данный дополнительный этап обеспечит оптимальную чувствительность.

Q

Для подготовки ПЦР-смеси для проведения более, чем одной реакции, необходимо умножить значение в колонке "Объем" на количество реакций, которые необходимо выполнить + одна дополнительная реакция.

4

- Аккуратно перемешать пипетированием. Не встряхивать.
- Добавить пипеткой 18 мкл ПЦР-смеси в каждую лунку многолуночного планшета LightCycler® 480.
- Добавить 2 мкл РНК-матрицы.
- Герметично закрыть планшет запечатывающей пленкой LightCycler® 480.

5 • Поместить планшет в центрифугу и сбалансировать соответствующим противовесом (*например*, другим планшетом).

• Центрифугировать в течение 2 минут при $1500 \times g$ в стандартной центрифуге с поворотной лопаткой и ротором для планшета с соответствующими адаптерами.

6 Загрузить планшет в прибор LightCycler® 480.

7 Запустить программу ПЦР, описанную выше.

 Если используются объемы реакции, отличные от 20 мкл, убедитесь, что Вы правильно отрегулировали значение объема реакции в текущем протоколе. Для начала мы рекомендуем использовать те же периоды выдержки, как и для реакции объемом 20 мкл.

2.3 Смежные процедуры

Цветовая компенсация

Для получения информации по генерации и использованию файла цветовой компенсации, см. руководство пользователя прибора LightCycler® 480 или онлайн ресурс на сайте LightCycler® 480 (www.lightcycler480.com).

Предотвращение перекрестной контаминации

Для предотвращения перекрестной контаминации при ПЦР используется урацил-ДНК-гликозилаза (UNG). Данная технология основывается на включении дезоксиуридинтрифосфата (дУТФ) в продукты амплификации и предварительной обработке всех последующих ПЦР- смесей при помощи UNG. Если в ПЦР-смеси есть такие ампликоны, UNG отщепляет урацил. Следовательно, получившиеся абазические участки гидролизуются высокими температурами во время первичного этапа денатурации и не могут служить матрицами ПЦР. Нормальная ДНК содержит тимидин, но не содержит уридин, поэтому данная процедура не оказывает на нее никакого влияния.

 Во время ОТ-ПЦР используйте только термостабильную урацил-ДНК-гликозилазу. Не используйте стандартную урацил-ДНК-гликозилазу из кишечной палочки: обладая более высокой термостабильностью, UNG из кишечной палочки разрушит вновь синтезированные цепи кДНК.

Для предотвращения перекрестной контаминации с использованием термостабильной UNG необходимо выполнить следующее:

1 При конечном объеме реакции в 20 мкл, добавить 1 мкл термостабильной UNG в ПЦР-смесь.

2 Добавить РНК-матрицу и инкубировать реакционную смесь в течение 5 минут при средней температуре, чтобы разрушить загрязняющие матрицы.

3 Инактивировать термостабильную UNG, выполнив этап обратной транскрипции при температуре 61-63°C.

3. Результаты

Количественный анализ

Следующие кривые амплификации были получены на основе использования набора реагентов LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes в сочетании с

- зондом #11 из Универсальной библиотеки зондов к мРНК β-актина человека и раствором (клетки HeLa) тотальной РНК человека (Рис. 1 и 2).
- гидролизным зондом, специфичным для мРНК ApoE человека и растворы тотальной РНК печени человека (Рис. 3).

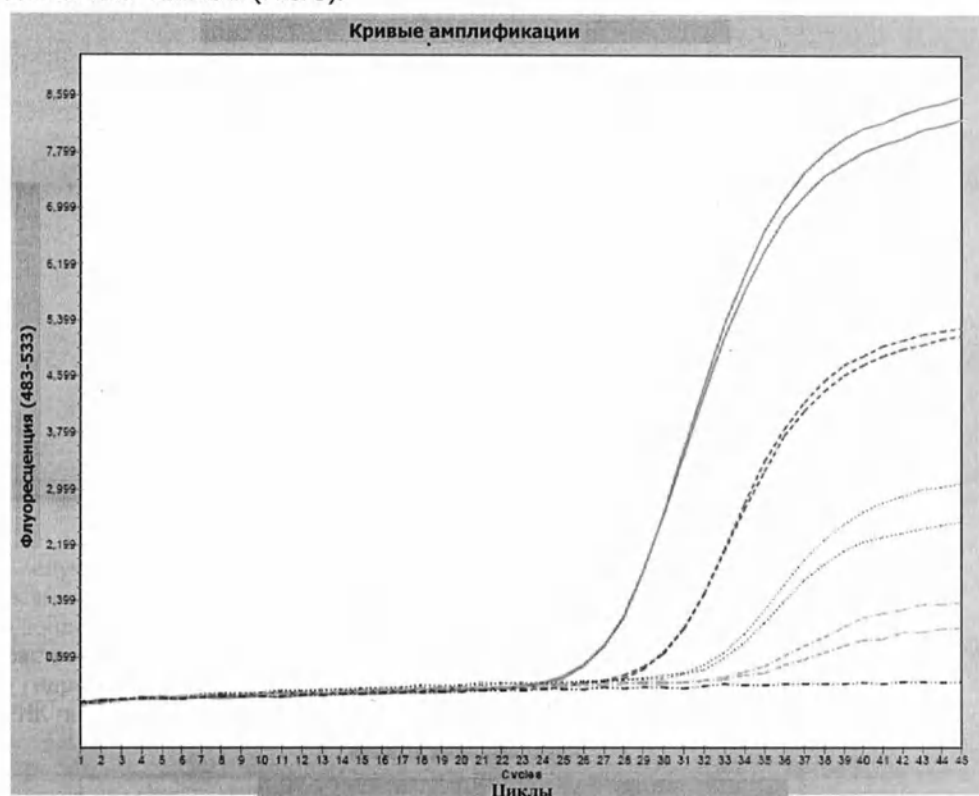


Рис. 1: Амплификация транскрипта β-актина из тотальной РНК (клетки HeLa) (100 пг [-], 10 пг [--], 1 пг [...], 0,1 пг [-.-], отрицательный контроль [-.-.-]). Образцы РНК были подвергнуты обратной транскрипции в парных репликациях в течение 3 минут при температуре 63°C. кДНК была амплифицирована в приборе LightCycler® 480 в соответствии с протоколом, представленным в параграфе "Системный протокол LightCycler® 480" на стр 7. ПЦР-продукты, присутствие только β-актину, были выявлены с помощью зонда #11 из Универсальной библиотеки зондов и проанализированы в модуле AbsQuant программного обеспечения LightCycler® 480.

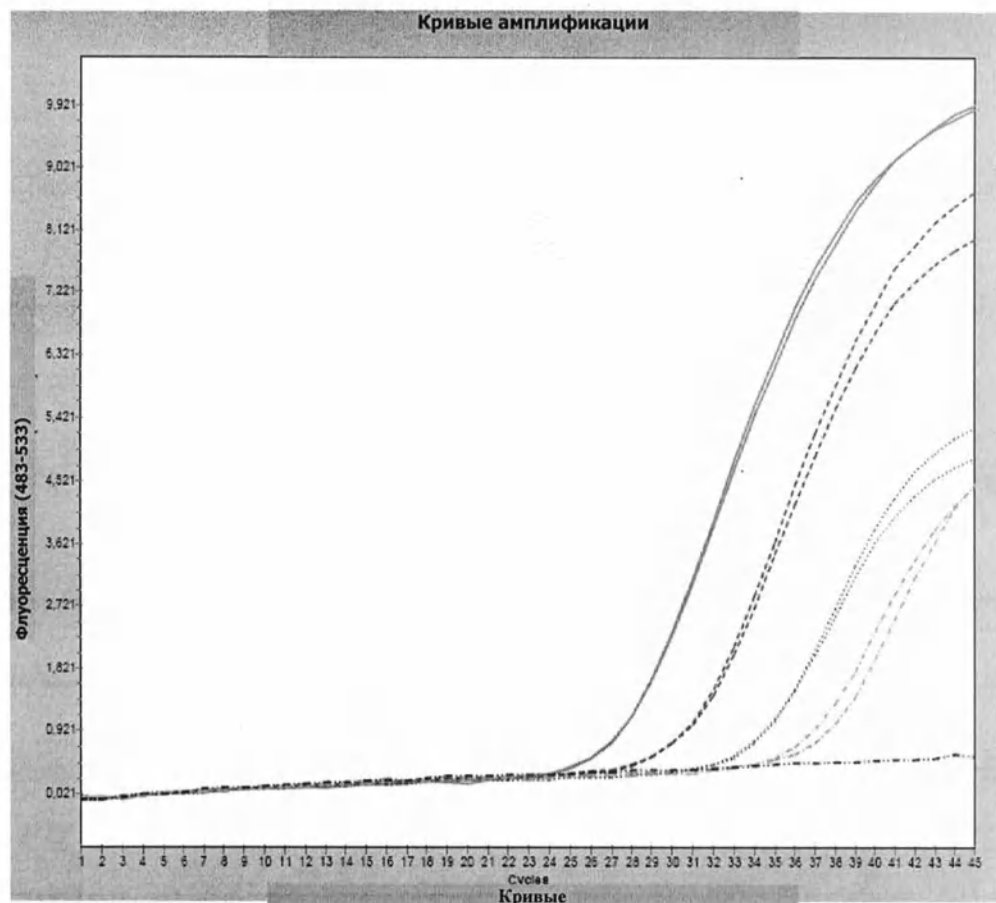


Рис. 2: Амплификация транскрипта β -актина из тотальной РНК (клетки HeLa) (100 пг [-], 10 пг [--], 1 пг [...], 0,1 пг [-.-], отрицательный контроль [-.-.-]) **при наличии Энхансера**. Образцы РНК были подвергнуты обратной транскрипции в парных репликациях в течение 3 минут при 63°C. кДНК была амплифицирована в приборе LightCycler® 480 в соответствии с протоколом, представленным в параграфе "Системный протокол LightCycler® 480" на стр.7. ПЦР продукты, присущие только β -актину, были выявлены с помощью зонда #11 из Универсальной библиотеки зондов и проанализированы в модуле AbsQuant программного обеспечения LightCycler® 480.

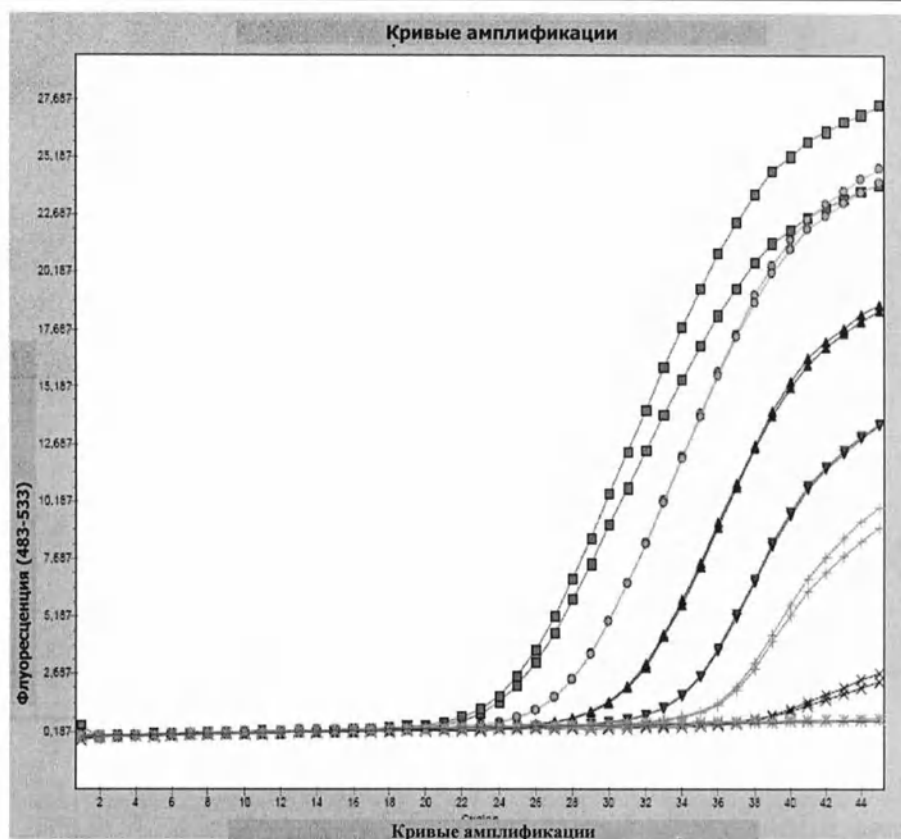


Рис. 3: Амплификация транскрипта ApoE (76% содержания GC) из totalной РНК человеческой печени (100 нг [■], 10 нг [●], 1 нг [▲], 0,1 нг [▼], 10 pg [+], 1 pg [×], отрицательный контроль [*]).

РНК была подвержена обратной транскрипции в течение 3 минут при 63°C. кДНК была амплифицирована в приборе LightCycler® 480 в соответствии с протоколом, представленным в "Системном протоколе LightCycler® 480" на стр 7. ПЦР продукты, присущие только ApoE, были обнаружены FAM/TAMRA-меченым гидролизным зондом, и проанализированы в модуле AbsQuant программного обеспечения LightCycler® 480.

4. Выявление ошибок и их исправление

	Возможные причины	Рекомендации
Интенсивность флуоресценции варьируется	Некоторые реактивы все еще находятся в верхней части лунки, либо в лунку попал воздушный пузырек.	Повторить центрифугирование, но уделить этому процессу больше времени (<i>например</i> , 2 минуты при 1500 × g), чтобы все реагенты попали на дно лунки, и/или воздушные пузырьки были вытеснены.
	Кожные жиры или грязь на поверхности лунки.	Всегда надевайте перчатки при работе с многолунчным планшетом.
Интенсивность флуоресценции очень низка	Низкая концентрация либо ухудшение качества красителей в реакционных смесях из-за некорректного хранения красителя.	• маркированные красителем реактивы необходимо предохранять от воздействия света. • Реагенты можно хранить при температуре от – 15 до – 25°C и избегать повторного замораживания и размораживания.
	Низкая эффективность ПЦР (условия реакции не оптимизированы).	• Первичная концентрация праймеров должна составлять от 0,2 до 1,0 мкМ, концентрация зонда – от 0,05 до 0,25 мкМ. • Проверьте температуру отжига праймеров и зондов. • Проверьте экспериментальный протокол. • Всегда проводите положительный контроль образцов. • Увеличьте количество РНК-матрицы до 500 нг общей РНК или 100 нг иРНК. • Для улучшения динамического диапазона или возбуждения флуоресцентного сигнала при использовании РНК низкой концентрации, необходимо добавить энхансер (1 мкл на реакцию в объеме 20 мкл).
	Выбранное время измерения не достаточно.	• Выберите соответствующий формат детекции «Roche» в сочетании с «динамичным» режимом детекции или • Повысьте время измерения при использовании «ручного» режима детекции. 🕒 Для получения более подробной информации обращайтесь к руководству по применению LightCycler® 480.
	Ингибирующее действие из-за недостаточной очистки образцов.	• Не используйте более 8-10 мкл общей РНК на 20 мкл каждой реакционной ОТ-ПЦР-смеси. • Повторно очистите нуклеиновую кислоту для обеспечения полного удаления ингибирующих агентов.
	Неподходящий зонд.	• Проверьте последовательность и размещение гидролизного зонда. • Проверьте продукт ПЦР на агарозном геле.
	Неподходящие праймеры	• Проверьте последовательность праймеров. • Проверьте ПЦР-продукт на агарозном геле.
	Дегградация РНК по причине несоответствующих условий хранения или выделения.	• Проверьте качество РНК на геле. • По возможности проверьте РНК с проверенными парами праймеров.
Образец для отрицательного контроля дает положительный сигнал	Контаминация	• Вновь приготовьте основные растворы. • Пипетируйте реагенты в чистом боксе. • Используйте термолабильную UNG для устранения перекрестной контаминации.
	Ошибки пипетирования или пропущенные реактивы.	• Проверьте, не пропущены ли реактивы. • Проверьте, не пропущены ли красители и не являются ли они дефектными.

Выявление ошибок и их исправление

Возможные причины	Рекомендации
Масштаб осей на графике не подходит для анализа	Измените значения осей x и y двойным кликом по максимальным и минимальным значениям, затем задать необходимые значения.
Длина ампликона >500 н.п.	Не используйте ампликоны >500 н.п. Для получения оптимальных результатов необходимо использовать ампликоны 100 н.п. или менее.
Загрязненный материал для образцов ингибирует реакцию.	• Разбавьте образец в пропорции 1:10 и повторить анализ. • Повторно очистить нуклеиновую кислоту для обеспечения удаления ингибирующих агентов.
Сложная матрица (например, GC-богатая).	• Повторить ОТ-ПЦР в таких же условиях и добавить энхансер. • Если результаты по-прежнему не удовлетворительны, отрегулируйте температуру отжига в сочетании с энхансером.

5. Дополнительная информация о продукте

Как действует продукт

Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 представляет собой простую в использовании реакционную смесь с «горячим стартом», специально адаптированную для одношагового ПЦР-анализа с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с помощью прибора LightCycler® 480. Ампликон детектируется путем мониторинга флуоресценции с использованием гидролизных зондов, специфичных для мишени (не поставляется в комплекте). Амплификация и онлайн мониторинг РНК-мишени достигается путем комбинированных процедур в приборе LightCycler® 480. Результаты интерпретируются непосредственно после завершения ОТ-ПЦР-анализа. Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 обеспечивает удобство, высокую эффективность, повторяемость и снижает до минимума риск контаминации. Необходимо добавить только РНК-мишень, ПЦР-праймеры, гидролизный зонд и $Mn(OAc)_2$. Возможность «горячего старта» набора реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 достигается благодаря использованию *Tth* ДНК-полимеразы в сочетании с Аптамерами. *Tth* ДНК-полимераза является термостабильным ферментом с РНК-зависимой активностью обратной транскриптазы и ДНК-зависимой полимеразной активностью, что позволяет комбинировать обратную транскрипцию и ПЦР в ходе реакции в одной пробирке. Аптамеры – это специальные олигонуклеотиды, которые связываются в активном центре полимеразы и предотвращают ее присоединение к мишеням нуклеиновых кислот при температурах ниже оптимальной температуры работы *Tth* ДНК-полимеразы. Таким образом, удлинение праймера не возникает во время установки реакции и следующей фазы нагревания перед этапом обратной транскрипции. При более высоких температурах, Аптамеры высвобождаются из фермента, после чего возможна инициация обратной транскрипции или полимеризации ДНК. Кроме того, рекомендуемая температура инкубации для обратной транскрипции с *Tth* ДНК-полимеразой (61°C) позволяет предотвратить образование вторичных структур РНК. Это способствует высоко специфичному и эффективному синтезу кДНК, и, в свою очередь, к высоко специфичному и чувствительному ПЦР-анализу. «Горячий старт» с Аптамерами высокоэффективен и крайне удобен, так как в этом случае не требуются дополнительные этапы инкубации, работы с пипеткой или продление времени реакции. Протокол «горячего старта» с Аптамерами не мешает другим ферментативным процессам, оперативной детекции продуктов амплификации или последующим этапам.

**Принцип
проведения теста**

Детекция ПЦР-продуктов со специфической последовательностью основывается на использовании олигонуклеотидных зондов со специфической последовательностью, соединенных с флуорофорами. Данные зонды гибридизируются на комплементарную последовательность в ПЦР-мишенях. Зонды, подходящие для использования в приборе LightCycler® 480, могут представлять из себя зонды с одной меткой, гибридизационные зонды и гидролизные зонды. В гибридизационных и гидролизных зондах используется, так называемый, принцип FRET. Принцип FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) основан на переносе энергии с одного флуорофора (донор или репортер) на другой смежный флуорофор (акцептор или гаситель). Технологию детекции с помощью гидролизных зондов можно технически описать как гомогенную 5'-нуклеазную технологию, так как одиночный не удлиняемый зонд 3', расщепляемый во время амплификации ПЦР, используется для детекции аккумуляции специфической последовательности ДНК-мишени (1). Такой одиночный зонд содержит два маркера, флуоресцентный репортер и гаситель, находящиеся в непосредственной близости. Когда зонд является интактным, краситель - гаситель находится достаточно близко к репортерному красителю для подавления флуоресцентного сигнала репортера (флуоресцентный гашение происходит за счет FRET). По время ПЦР, 5'-нуклеазная активность полимеразы расщепляет гидролизный зонд, отделяя репортер и гаситель. Краситель-репортер больше не гасится и при возбуждении испускает флуоресцентный сигнал. Прибор LightCycler® 480 может детектировать гидролизные зонды, маркированные красителями - репортерами LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Cyan 500, FAM или HEX (или любая другая краска, подходящая для эмиссионных и детекционных фильтров прибора LightCycler® 480). Такие маркированные гидролизные зонды можно использовать отдельно или в комплексе, что дает возможность проводить моно- или мультицветовую детекцию.

③ Для мультицветовых исследований с гидролизными зондами рекомендуется использовать темные красители-гасители (*например*, молекулы красителя, которые эффективно гасят флуоресценцию красителя-репортера FRET-типа, при этом сами не испускающие флуоресценцию). Roche Applied Science рекомендует использовать BHQ-2 (диапазон гашения 550 – 650 nm) для всех красителей-гасителей гидролизных зондов, перечисленных выше.

Ссылки

1 Holland, P.M. et al (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 7276-7280.

Контроль качества

Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами LightCycler® 480 был функционально опробован с использованием системы для ПЦР в режиме реального времени LightCycler® 480.

6. Дополнительная информация

6.1 Условные обозначения

6.1.1 Условные обозначения в тексте

Для того, чтобы информация была последовательной и легко запоминающейся, в данном Руководстве по применению используются следующие условные обозначения:

Условные обозначения в тексте	Значение
Нумерованные инструкции, маркированные ①, ② и т.д.	Этапы проведения процесса, которые обычно выполняются в указанной последовательности
Нумерованные инструкции, маркированные 1, 2 и т.д.	Этапы проведения процесса, которые должны выполняться в указанной последовательности
Звездочка *	Обозначает продукт, поставляемый компанией Roche Applied Science

6.1.2 Символы

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

Значение символа	
	Информационное Примечание: Дополнительная информация о текущей теме или процедуре.
	Важное Примечание: Информация, необходимая для успешного осуществления процесса или использования продукта.

6.2 Изменения с последнего издания

Добавлен прибор
LightCycler 480 - II

6.3 Как сделать заказ

Roche Applied Science предлагает большой выбор реактивов и систем для исследований в сфере науки о жизни. Полный перечень продукции и руководств по применению вы можете получить на нашем сайте

www.roche-applied-science.com,

и профессиональных сайтах (Special Interest Sites), в том числе:

- Системы проведения ПЦР в режиме реального времени (вращающаяся система LightCycler®, система LightCycler® 480, и универсальная библиотека зондов): www.lightcycler.com

- Автоматизированная подготовка образцов (прибор MagNA Lyser, компактная система MagNA Pure Compact и система MagNA Pure LC): www.magnapure.com

	Продукт	Размер упаковки	Кат. No.
Приборы и аксессуары	Прибор LightCycler® 480 II	1 прибор (96 лунок)	05 015 278 001
		1 прибор (384 лунок)	05 015 243 001
	Термоблок для 96-луночного планшета LightCycler® 480	1 термоблок	05015 197 001
	Термоблок для 384-луночного планшета LightCycler® 480	1 термоблок	05 1015 219 001
	96-луночный планшет LightCycler® 480	50 планшето с запечатавающей пленкой	04 729 692 001
	384-луночный планшет LightCycler® 480	50 планшето с запечатавающей пленкой	04 729 749 001
	Запечатавающая пленка LightCycler® 480	1 x 50 пленок	04 729 757 001
	LightCycler® 480 Software, Version 1.5	1 пакет ПО	04 994 884 001
	LightCycler® 480 LIMS Interface Module	1 пакет ПО	05 066 310 001
	LightCycler® 480 Gene Scanning Software	1 пакет ПО	05 103 908 001
Программное обеспечение	LightCycler® 480 Multiple Plate Analysis Software	1 пакет ПО	05 075 122 001
	Наборы реагентов для ПЦР LightCycler® 480 LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 x 1 мл (5 x 100 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 516 001
		10 x 5 мл (10 x 500 реакций, 20 мкл каждая)	04 887 352 001
		5 x 1 мл (5 x 100 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 494 001
		10 x 5 мл (10 x 500 реакций, 20 мкл каждая)	04 887 301 001
	LightCycler® 480 Probes Master	1 x 50 мл (5000 реакций, 20 мкл каждая)	04 902 343 001
		4 x 384 мкл (384 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 494 001
	LightCycler® 480 Genotyping Master	1 комплект (для 3 серий опытов)	04 710 924 001
	LightCycler® 480 Control Kit		

Дополнительная информация

	Продукт	Размер упаковки	Кат. No.
Универсальная библиотека зондов	Универсальная библиотека зондов, человеческая		04 683 633 001
	Универсальная библиотека зондов, мышьяная	Библиотека из 90 уже утвержденных зондов для детекции	04 683 641 001
	Универсальная библиотека зондов, крысиная		04 683 650 001
	Универсальная расширенная библиотека зондов	Библиотека из 75 уже утвержденных зондов для детекции (зонды с #91 по #165)	04 869 877 001
Вспомогательные наборы и реактивы	Урацил-ДНК-гликозилаза, термолабильная	100 ед.	11 775 367 001
	LightCycler h-G6PDH	500 ед.	11 775 375 001
	Housekeeping Gene Set	1 набор (96 реакций)	03 261 883 001
	Transcriptor Reverse Transcriptase	250 ед.	03 531 317 001
		500 ед.	03 531 295 001
		2000 ед.	03 531 287 001
	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 набор	04 379 012 001
	First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	1 набор	11 483 188 001

6.4 Лицензия на ответственное использование

Наличие лицензии на выполнение процесса 5' нуклеазы для исследований обязует использовать лицензированный 5' нуклеазный комплект (содержащий Лицензированные зонды) или авторизованный основной комплект в сочетании с Лицензированным зондом, кроме того, лицензионные права можно приобрести у «Applied Biosystems». Данный продукт является Авторизованным основным комплектом без лицензированного зонда. Его закупочная цена включает ограниченный, не подлежащий передаче, иммунитет от судебных разбирательств в соответствии с Патентами США, номера 5,210,015, 5,487,972, 5,476,774 и 5,219,727 и соответствующими патентными притязаниями за пределами Соединенных Штатов, принадлежащими «Roche Molecular Systems, Inc.» или «F. Hoffmann-La Roche Ltd» («Roche») на использование только данного объема продукции в практике 5' – нуклеазного процесса только для внутренних исследований и разработок покупателя. Данный продукт также является Авторизованным основным комплектом для использования с сервисными сублицензиями от компании «Applied Biosystems». Данный продукт не передает каких-либо прав в соответствии с Патентами США, номера 5,804,375, 6,214,979, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, или 6,258,569, или соответствующими патентными притязаниями за пределами Соединенных Штатов, в прямой форме, косвенно или путем процессуального отвода. Таким образом, никакие права в соответствии с любыми другими патентными претензиями (например, претензии на приборы и системы в Патентах США, № 6,814,934) и никакие права на выполнение коммерческих услуг любого вида, в том числе без ограничения, право на передачу информации о результатах деятельности покупателя за определенную плату или в других коммерческих целях, не дается в прямой форме, косвенно или путем процессуального отвода. Данный продукт предназначен только для исследовательских целей. Использование в диагностических целях требует получения отдельной лицензии в компании «Roche». Более подробную информацию по получению лицензий для выполнения ПЦР-анализов в режиме реального времени можно получить, обратившись к Директору по лицензированию, компания «Applied Biosystems», по следующему адресу: 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA. Компоненты программного обеспечения, используемые для системы LightCycler® 480, лицензированы в компании «Idaho Technology Inc.», Солт Лейк Сити, штат Юта, США. По лицензии «Gilead Sciences Inc.».

6.5 Торговые марки

LIGHTCYCLER, LC, MAGNA PURE и HIGH PURE являются торговыми марками «Roche». PROBELIBRARY является зарегистрированной торговой маркой «Exiqon A/S», Ведбаек, Дания. Другие торговые марки или названия продуктов являются торговыми марками соответствующих владельцев.

Контактная информация и поддержка

Если у Вас возникают вопросы или проблемы с данным или другим продуктом «Roche Applied Science» (RAS), просим Вас связаться с подразделением технической поддержки. Наши научные сотрудники обязуются предоставить скорую и эффективную помощь.

Мы также хотели бы, чтобы Вы обращались к нам с предложениями об улучшении свойств продукции RAS или о новых или специализированных методах использования нашей продукции. Такая информация от потребителя бесценна для RAS и исследователей во всем мире.

Чтобы задать вопросы, решить проблемы, предложить какие-либо улучшения или сообщить о новых вариантах использования, просим вас посетить наш **онлайн сайт технической поддержки:**

www.roche-applied-science.com/support

Для того, чтобы позвонить, написать, отправить факс или электронное сообщение, посетите домашнюю страницу компании «Roche Applied Science», www.roche-applied-science.com, и выберите вашу страну.

На сайте отразятся контактные данные в вашей стране.

На домашней странице «Roche Applied Science» выберите **«Печатные материалы» (Printed Materials)** и вы найдете:

- развернутые технические руководства
 - часто задаваемые вопросы по лаборатории: протоколы и ссылки по исследованиям науки о жизни
 - наш ежеквартальный информационный бюллетень «Biochemica»
 - справочный листок по безопасности материалов
 - вкладыши и инструкции по использованию продукции и запросить жесткие копии печатных материалов.
-

0107.05023262001①



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»



М. Петрович

«02» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Флуоресцентный краситель с длиной волны детекции 500 нм для мечения зондов (LightCycler 480 CYAN 500 Labeling Reagent)

Для лабораторных исследований.
Не рекомендуется использовать в диагностических целях.
ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *IN VITRO*.



Флуоресцентный краситель с длиной волны детекции 500 нм для мечения зондов LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent

100 мкмоль. Для синтеза меченых олигонуклеотидов.

Кат. №. 04 764 153 001

Версия Октябрь 2007

Хранить при температурах от -15 до -25°C.



Хранить в защищенном от
света месте!

1. Назначение данного продукта

Содержание

- Одна бутылка содержит 100 мкмоль красителя LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent.
- Реагент поставляется в виде желтого порошка помещенного в специальные стеклянные флаконы, используемые для синтеза олигонуклеотидов.

Хранение и стабильность

Если продукт хранится в тщательно запечатанных флаконах при температуре от -15 до -25°C, то он стабилен до истечения срока годности, указанного на маркировке.



Краситель транспортируется в сухом льду.



Храните в сухом и защищенном от света месте.

Область применения

Краситель LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent предназначен для мечения олигонуклеотидов (в любом положении). Поэтому он может использоваться для синтеза гидролизных или гибридационных зондов, которые используются для детекции с различными форматами на приборе LightCycler® 480 при длине волны возбуждения равной 430 нм. Олигонуклеотиды реагируют с данным красителем во время твердой фазы фосфорамидитного метода синтеза. Для данного красителя можно использовать ту же методику, что и для обычного фосфорамидита (с увеличенным временем связывания) с того момента, когда он уже содержит диметоксиметильную группу. Краситель устойчив во время синтеза олигонуклеотидов. Поэтому очистка с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является простым и результативным методом, который позволяет получить заданный продукт хорошего качества. Олигонуклеотиды меченые красителем LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent имеют максимум возбуждения при длине волны равной 450 нм и максимум излучения (эмиссии) при 500 нм (измеряются в 50mM Tris, pH 8,3). Это полностью соответствует требованиям прибора LightCycler® 480, предъявляемым к возбуждению.

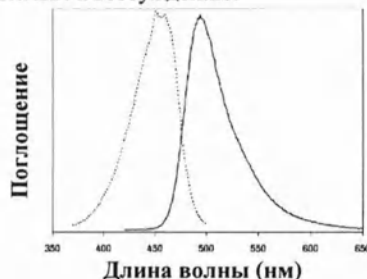


Рис 1: Спектр возбуждения и излучения олигонуклеотида, меченного красителем LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent.



3'-конец зонда должен быть блокирован, т.е. фосфорилирован для того, чтобы он не удлинялся во время ПЦР.



Рекомендуется использовать олигонуклеотиды с длиной равной 20-30 н.п.

Необходимые дополнительные реагенты и оборудование

- для приготовления раствора красителя LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent:
 - безводный ацетонитрил
 - инъекционная игла и шприц
 - для мечения и фосфорилирования зондов:
 - стандартные реагенты для синтеза олигонуклеотидов (тетразол и т.д.)
 - 30-33% раствор аммиака
 - прибор для синтеза ДНК (ДНК-синтезатор)
 - вакуумная сушка типа Speed Vac Concentrator и роторный испаритель (rotary evaporator)
 - 3'-фосфат-CPG (Controlled Pore Glass – стеклянный носитель с контролируемым размером пор (ЦПГ))-подложка или другой 3'-модификатор
 - меченый во втором положении фосфорамидит или ЦПГ
 - трет-бутилфеноксиацитил-дА-фосфорамидит
 - трет-бутилфеноксиацитил-дГ-фосфорамидит
 - трет-бутилфеноксиацитил-дЦ-фосфорамидит
 - дТ-фосфорамидит
 - ангидрид трет-бутилфеноксиацетильной кислоты для кэпирования
 - для очистки олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ:
 - ВЭЖХ
 - Среда Poros Oligo R3 (Amersham Pharmacia Biotech, Кат. №. 17-0546-01)
- Эта среда для разделения рекомендуется для получения оптимальных результатов очистки.
- 100mM триэтиламмониум ацетат pH 7,0
 - ацетонитрил
 - фотометр
- для количественного контроля олигонуклеотидов, очищенных с помощью ВЭЖХ:
 - диодно-матричный детектор или спектрофотометр
 - 10 mM Tris, pH 8,0



2. Работа с данным продуктом

2.1. Описание организации рабочего процесса

Процедура мечения гидролизных или гибридационных зондов красителем LightCycler® 480 Cyan состоит из следующих стадий:

- Приготовление раствора красителя LightCycler® 480 Cyan
- Синтез меченых олигонуклеотидов: мечение внутри, 5'-концевой области или 3'-псевдо-концевой области (во всех случаях 3'-конец фосфорилирован).

3'-конец + фосфат	Введение 3'-фосфатной группы осуществляется в начале синтеза олигонуклеотида с помощью соответствующего модифицированного CPG-подложки
-------------------	--
- Использование ОФ ВЭЖХ 'trityl on' и 'trityl off' для отделения меченых олигонуклеотидов от немеченых олигонуклеотидов и других примесей.
- Количественный контроль очищенных олигонуклеотидов с помощью измерения спектра поглощения в УФ и видимой области света при 200-600 нм. Подсчет выхода меченых олигонуклеотидов с помощью измерения A_{260} единиц.

Приготовление раствора красителя LightCycler® 480 Cyan

- 1 Инъектируйте 1,0 мл безводного ацетонитрила в запечатанный флакон с красителем LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent с помощью инъекционной иглы и шприца.
- 2 Растворите краситель LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent с помощью вращения флакона, до тех пор, пока все компоненты полностью не растворятся.
- 3 Удалите инъекционную иглу и прикрепите флакон к ДНК-синтезатору.



Если флакон невозможно закрепить, то отберите раствор шприцом и перенесите его в соответствующий резервуар прибора.

Синтез олигонуклеотидов меченых красителем LightCycler® 480 Cyan 500 (мечение одним красителем или в комбинации с другим красителем)

- 1 Подсоедините к прибору для синтеза ДНК колонку с 3'-фосфат CPG или колонку с 3' красителем CPG.
- 2 В зависимости от вида синтеза, прикрепите флакон с раствором красителя LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent (приготовление описано в главе 2.1) к соответствующему месту прибора или перенесите раствор в предназначенный для него резервуар. Если для второго красителя не требуется CPG, а требуется фосфорамидит, то укрепите флакон со вторым красителем и фосфорамидитом к соответствующему месту прибора.
- 3 Запрограммируйте ДНК-синтезатор. Для этого введите произвольно выбранное основание для 3'-терминальной области олигонуклеотида. 3'-терминальное основание последовательности олигонуклеотида должно быть введено как второе основание.
 - Введите требуемую последовательность и добавьте цикл мечения, в котором будет использоваться раствор из флакона, содержащий краситель LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent. Установите время присоединения красителя LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent равное 2 мин.
 - Если Вы используете фосфат-CPG в комбинации со вторым красителем, то введите требуемую последовательность и добавьте цикл мечения, в котором будет использоваться раствор из флакона, содержащий реагент для второго красителя.
 - Установите программу "Trityl on".
 - Начните синтез олигонуклеотидов.

- 4 Защитите Ваш олигонуклеотид после отщепления с помощью 30-33% раствора аммиака с CPG-подложки согласно протоколу для трет-бутил феноскиацетил фосфорамидата (2 ч при комнатной температуре).
- 5 Отфильтруйте раствор с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм.
- 6 Проведите обезвоживание раствора с помощью вакуумного испарителя.
- 7 Храните оставшуюся часть при температуре от -15 до -25°C.

Очистка олигонуклеотидов с помощью HPLC 'Trityl on'

- 1
 - Растворите олигонуклеотиды из секции 3.3 в 1 мл бидистиллированной воды.
 - Отфильтруйте раствор с помощью мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм.
 - Нанесите на колонку RP Poros Oligo R3.

Условия проведения HPLC следующие:

Буфер А	100 мМ триэтиламмониум ацетат, pH= 7,0
Буфер В	100 мМ триэтиламмониум ацетат, pH= 7,0/ацетонитрил 1:1 (V/V)
Градиент	20 мин от 0% буфера В до 100% буфера В
Скорость потока	6 мл/мин
Детекция	при 260 нм с помощью диодно-матричного детектора (предпочтительнее) или спектрофотометра.

На рисунке 2 показан типичный график элюции зонда меченного одним красителем в 3'-положении и на рисунке 3 показан типичный график элюции зонда меченного двумя красителями (второй краситель BNQ2 (Biosearch Technologies)).

- 3 Производите очистку в течение 2 мин с помощью 0 % буфера В а затем начните использовать градиент.
- 4 Часть продукта будет элюировать при 40% буфера В (зонд меченный одним красителем) и часть при 50% буфера В (зонд меченный двумя красителями).

меченных одним красителем используйте пики, полученные при 260 и 480 нм. Для зондов меченных двумя красителями используйте пики, полученные при 260 и 480 нм и при значении длины волны второго красителя (гасителя).

- 6 Продолжите эксперимент до концентрации буфера В равной 100%.
- 7 Промойте колонку с помощью 100% буфера В в течение 3 мин для следующего эксперимента.
- 8 Обезводьте полученный раствор олигонуклеотидов с помощью вакуума (например, с помощью Speed Vac Concentrator или rotary evaporator).
- 9 Осадок должен храниться при -4°C.

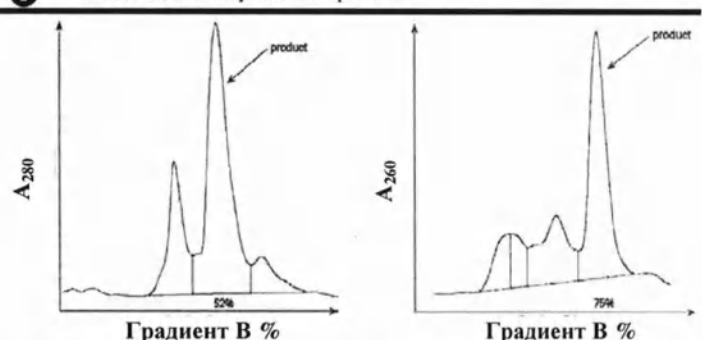


Рис. 2: Типичные графические результаты элюции олигонуклеотида, меченного красителем LightCycler® 480 Cyan 500-labeled в 3'-положении при проведении ВЭЖХ; Trityl on (А: градиент от 0% буфера В до 100% в течение 20 мин. Продукт элюируется примерно при 52 % буфера В.

Рис. 3: Типичные графические результаты элюции олигонуклеотида, меченного двумя красителями (LightCycler® 480 Cyan 500/BNQ2) при проведении ВЭЖХ; Trityl on (А: градиент от 0% буфера В до 100% в течение 20 мин. Продукт элюируется примерно 75% буфером В.

Детритилирование олигонуклеотидов и 'Trityl off' очистка (опционально)

- 1
 - Растворите олигонуклеотиды из секции 3.3 в 1 мл 80% уксусной кислоты.
 - Держите раствор в течение 15 мин при комнатной температуре.
 - Избавьтесь от растворителя с помощью вакуума (с помощью Speed Vac Concentrator или rotary evaporator).
 - Растворите оставшуюся часть в 1 мл бидистиллированной воды.
 - Отфильтруйте раствор с помощью мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм.
 - Нанесите на колонку RP Poros Oligo R3.

Условия проведения ВЭЖХ следующие:

Буфер А	100 мМ триэтиламмониум ацетат, pH 7,0
Буфер В	100 мМ триэтиламмониум ацетат, pH 7,0 ацетонитрил 1:1 (V/V)
Градиент	20 мин от 0% буфера В до 100% буфера В
Скорость потока	6 мл/мин
Детекция	при 260 нм с помощью диодно-матричного детектора (предпочтительнее) или спектрофотометра.

На рисунке 4 показан типичный график элюции зонда, меченного одним красителем в 3'-положении и на рисунке 5 показан типичный график элюции зонда, меченного двумя красителями (второй краситель BNQ2 (Biosearch Technologies)).

- 3 Начните использовать градиент после проведения эксперимента в течение 2 мин.
- 4 Остановите градиент при появлении абсорбции при 260 нм, а затем продолжите использовать градиент при уменьшении абсорбции.
- 5 Получите пики в соответствии с диодной матрицей. Для зондов, меченных одним красителем используйте пики, полученные при 260 и 480 нм. Для зондов меченных двумя красителями используйте пики, полученные при 260 и 480 нм и при значении длины волны второго красителя (гасителя).
- 6 Продолжите эксперимент до концентрации буфера В равной 100%.
- 7 Прочистите колонку с помощью 100% буфера В в течение 3 мин для следующего эксперимента.
- 8 Обезводьте полученный раствор олигонуклеотидов с помощью вакуума (например, с помощью Speed Vac Concentrator или rotary evaporator).
- 9 Растворите осадок в воде.

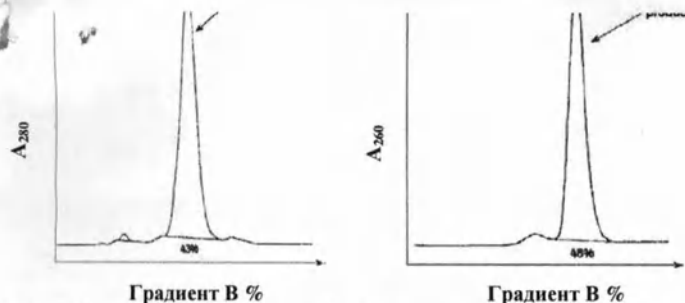


Рис. 4: Типичные графические результаты элюции олигонуклеотида, меченного красителем LightCycler® 480 Cyan 500 в 3'-положении при проведении ВЭЖХ; Trityl off (A: градиент от 0% буфера В до 100% в течение 20 мин. Продукт элюируется примерно 43 % буфером В.

Рис. 5: Типичные графические результаты элюции олигонуклеотида, меченного двумя красителями (LightCycler® 480 Cyan 500/BNQ2) при проведении ВЭЖХ; Trityl off (A: градиент от 0% буфера В до 100% в течение 20 мин. Продукт элюируется примерно 48% буфером В.

Количественный контроль очистки олигонуклеотидов с помощью HPLC

1.
 - Растворите осадок (из секции 3.4) в 1 мл бидистиллированной воды.
 - Добавьте 40 мкл этого раствора к 760 мкл 10 мМ Tris, pH 8,0. Полученный раствор поместите в кювету.
 - Измерьте экстинкцию при 260 нм.
2.
 - Умножьте значение экстинкции на 20 даст значение единиц A_{260} . Переведите значение экстинкции в количество молей олигонуклеотида, состоящего из 20 нт. Одна единица A_{260} соответствует 5 нмоль олигонуклеотида, состоящего из 20 н.п.



При проведении олигонуклеотидного синтеза концентрацией порядка 0,2 мкмоль, выход очищенного меченого олигонуклеотида составляет примерно 10-25%, что соответствует 20-50 нмоль (олигонуклеотида с длиной равной 20 нт).

3. Храните осадок при температуре от -15 до -25°C.
4. Исследуйте UV/VIS спектр поглощения при 200-600 нм. Результаты данного исследования показаны на следующих графиках.

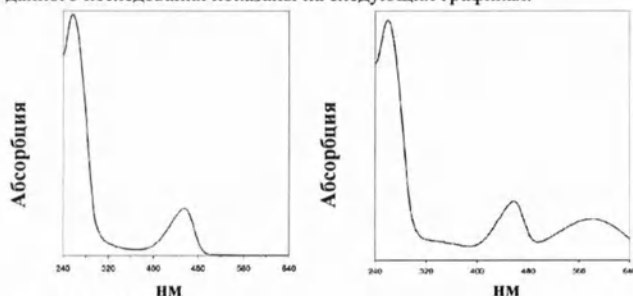


Рис. 6: UV/VIS спектр поглощения олигонуклеотидов, меченных одним (слева) и двумя (справа) красителями.

5. Используя значения UV/VIS спектра поглощения, посчитайте отношения величин экстинкций при 495 нм к 260 нм. Следующая таблица показывает зависимость отношения величин экстинкций от длины олигонуклеотидов:

Длина олигонуклеотидов	Отношение (A_{495}/A_{260})
20 нт	0,18-0,20
25 нт	0,16-0,18
30 нт	0,10-0,16

3. Дополнительная информация о продукте

Справочная информация

Реакционная смесь LightCycler® 480 Cyan 500 Labeling Reagent является коммерческим продуктом, предназначенным для мечения олигонуклеотидов красителем LightCycler® 480 Cyan 500 по внутреннему или концевому положению. Данный краситель имеет максимум возбуждения при 450 нм и поэтому он специально предназначен для прибора LightCycler® 480. Также краситель улучшает проведение мультиплексных экспериментов, которые используют два различных красителя-донора.

4. Вспомогательная информация

4.1 Условные обозначения

Текстовые обозначения

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

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

Символы

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

4.2. Аббревиатуры

В данной инструкции используются следующие аббревиатуры:

Аббревиатура	Расшифровка
ABS	Поглощение
CPG (ЦПГ)	Стекланный носитель с контролируемым размером пор
dd	Бидистиллированный
ОФ	Обратная фаза
SNP	Полиморфизм одного нуклеотида
UV	Ультрафиолет
VIS	Видимый свет

4.3 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 для ПЦР в реальном времени (система LightCycler® карусельного типа, система LightCycler® 480 и универсальная библиотека зондов): www.lightcycler.com

Продукт	Комплектация	Кат.№
Прибор LightCycler® 480	1 прибор (для 96-луночных планшетов)	04 640 268 001
	1 прибор (для 384-луночных планшетов)	04 545 885 001
LightCycler® Probes Master (Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами)	1 набор (5x 100 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 494 001
LightCycler® 480 Genotyping Master (Набор реагентов для генотипирования)	1 набор (4x 96 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 524 001
LightCycler® Red 640-Nhydroxysuccinimide Ester (Краситель Red 640 N-гидроксисукцинимидный эфир)	1 виал	12 015 161 001
LightCycler® Red 610-Nhydroxysuccinimide Ester (Краситель Red 610 N-гидроксисукцинимидный эфир)	1 виал	03 561 488 001
LightCycler® Fluorescein CPG (Флюоресцеин ЦПГ)	1 г	03 138 178 001
SimpleProbe 519 Labeling Reagent (Флуоресцентный краситель с длиной волны детекции 519 нм для мечения зондов)	100 мкмоль	04 687 132 001

Изменения относительно предыдущей версии

Коррекция в форматировании параграфа 2.1. Количественный контроль очистки олигонуклеотидов с помощью HPLC.

Ограничения, налагаемые лицензией

Данный продукт продается только для нужд покупателей. Запрещена продажа или сбыт данного продукта или продукта, полученного в результате использования данного продукта любой другой стороной. Запрещается использовать в коммерческих нуждах олигонуклеотиды или другие продукты меченные данным продуктом.

Покупка данного продукта включает ограниченную, не передающуюся и потребительскую лицензию на использование продукта для технологии использующей гибридизационные зонды (Hybridization Probe Technology) по U.S. Patent No. US 6,174, 670 и 6,245,514 и другим иностранным аналогам патентов принадлежащих Idaho Technology.

Торговые марки

LIGHTCYCLER является торговой маркой Roche.

Другие брэндсы или названия продукта являются торговыми марками ее непосредственных владельцев.

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. Используйте опцию "Product Search" для поиска вкладышей к наборам и сведений о безопасности продукта.



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»

М. Петрович

«02» апреля 2009г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Флуоресцентный краситель с длиной волны детекции 519 нм для мечения зондов (Simple Probe 519 Labeling Reagent)

Флуоресцентный краситель с длиной волны детекции 519 нм для мечения зондов SimpleProbe 519 Labeling Reagent

100 мкмоль. Для синтеза меченых олигонуклеотидов.
Кат № 04 687 132 001

Версия июнь 2006

Хранить при температуре от -15°C до -25°C
Не подвергать воздействию света

1. Что представляет собой данный продукт

Состав

- Один флакон содержит 100 мкмоль флуоресцентного красителя с длиной волны детекции 519 нм для мечения зондов SimpleProbe.
- Реагент представляет собой желтое твердое (плотное) вещество, помещенное в стеклянные флаконы, пригодные для использования в олигонуклеотидных синтезаторах.

Условия хранения и стабильность

Если вещество хранится в плотно запечатанном флаконе при максимальной температуре от -15 до -25 °C, реагент остается стабильным до истечения срока годности, указанного на этикетке.

! Реактив транспортируется в сухом льду.

NB: Хранить в сухом месте и не подвергать воздействию света.

Применение

Реагент SimpleProbe 519 Labeling Reagent используется для внутреннего мечения зондов для детекции мутаций, которые могут быть использованы в формате SimpleProbe на приборах LightCycler® 1.5, LightCycler® 2.0, LightCycler® 480 или LightType®. Олигонуклеотиды реагируют с реагентом SimpleProbe 519 Labeling Reagent во время твердой фазы фосфорамидитом синтетическом методе. Этот реактив также может использоваться как и стандартный фосфорамидит (время на образование пары - 2 минуты), так как он содержит диметокситриловую группу. Реактив устойчив во время олигонуклеотидного синтеза. Поэтому, очистка ВЭЖХ проходит легко и приводит к получению четко специфичного продукта. Олигонуклеотиды, внутренне маркированные при помощи реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent показывают максимум возбуждения в 494 нм и максимуму эмиссии в 519 нм (измеренные в 50 mM Трис, pH 8.3).

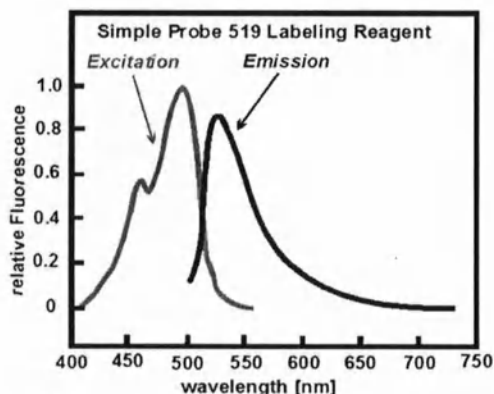


Рис. 1: Спектры возбуждения и эмиссии олигонуклеотидов, внутренне меченных с помощью реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent.

! 3'-конец зонда должен быть фосфорилирован, чтобы не допустить его удлинение во время ПЦР.

! Рекомендуемая длина олигонуклеотидов 20 – 30 нуклеотидов.

Дополнительное оборудование и реагенты, необходимые для:

- для приготовления раствора реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent:
 - безводный ацетонитрил
 - шприц/игла
- для маркировки олигонуклеотидов и фосфорилирования
 - стандартные реагенты для олигонуклеотидного синтеза (тетразол, и т.д.)
 - 30-33%-ый аммиак
 - синтезатор ДНК
 - вакуумная центрифуга
 - 3'-фосфатная подложка CPG
 - N6-Bz-dA-фосфорамидит
 - N2-iBu-dG- фосфорамидит
 - N4-Bz-dC- фосфорамидит
 - T- фосфорамидит
- для олигонуклеотидной очистки ВЭЖХ
 - ВЭЖХ
 - Mono Q HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech, Категория № 17 - 0546-01),

NB Эта среда для разделения рекомендуется для получения оптимальных результатов очистки.

- гидроксид натрия (10 mM; pH ~12)
- хлорид натрия (1 M.)
- фотометр
- для контроля качества ВЭЖХ-очищенного олигонуклеотида
 - фотометр
 - 1 M буфер бората натрия (pH 8.5)

2. Как использовать данный продукт

2.1 Краткий обзор технологического процесса

Процедура получения маркированного зонда SimpleProbe, с применением реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent, включает следующие этапы:

1. Приготовление раствора реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent
 2. Синтез олигонуклеотидов, включая внутреннее мечение и 3'-фосфорилирование:

3'-конец	Введение 3'-фосфатной группы путем инициирования олигонуклеотидного синтеза с применением соответствующей модифицированной подложки CPG
внутренне	Реакция мечения с применением реагента SimpleProbe 519 Labeling Reagent в определенном цикле синтеза, с целью получения зонда для детекции мутаций, маркированного в определенном положении, согласно правилам конструирования зондов.
 3. IEX-ВЭЖХ, чтобы отделить меченые олигонуклеотиды от немеченых олигомеров и примесей.
 4. Контроль качества очищенных олигонуклеотидов проводят с помощью измерения спектра поглощения UV/VIS в диапазоне 200 - 600 нм.
- Вычисление количества полученного меченого олигонуклеотида путем измерения единиц A260.

Приготовление раствора флуоресцентного красителя с длиной волны детекции 519 нм для мечения зондов.

1. Введите 1,0 мл безводного ацетонитрила в запечатанный флакон с реагентом SimpleProbe Labeling Reagent, используя шприц с иглой.
2. Потрясите бутылку с раствором, до полного растворения реагентов. В случае необходимости, профильтруйте полученный раствор с помощью 0,45 мкм мембранного фильтра шприца (мембрана должна быть устойчивой к органическим соединениям).
3. Удалите иглу и поместите флакон в синтезатор ДНК.
! Если бутылка не может быть присоединена к аппарату, заберите раствор в шприц и переместите его в соответствующую емкость синтезатора.

Олигонуклеотидный синтез, фосфорилирование и мечение.

1. Соедините синтезатор ДНК с 3'-фосфатной колонкой CPG. Используйте 0,2 мкмоль фосфатную подложку CPG.
2. В зависимости от типа используемого синтезатора, поставьте флакон с раствором (подготовленным как описано в пункте 2.1) в соответствующее положение, или перенесите раствор в соответствующую емкость.
3. Запрограммируйте синтезатор, введя произвольное основание в 3'-концевой олигонуклеотид. Запланированных 3'-концевой нуклеотид олигонуклеотида должен быть введен как второе основание.
• Введите желательную последовательность и задайте, в качестве цикла пометки, место, где располагается бутылка с раствором SimpleProbe Labeling Reagent. Увеличьте время присоединения реагента Simple Probe Labeling Reagent до 2 минут.
• Установите программу "Trityl off"
4. Запустите процесс олигонуклеотидного синтеза.
4. Снимите защиту олигонуклеотида после расщепления 30 – 33% раствором аммиака с подложки CPG в соответствии с протоколом для стандартных фосфорамидитов (50 – 55 °C в течение 8 часов).
5. Профильтруйте раствор при помощи 0,45 мкм мембранных фильтров.
6. Выпарьте раствор под вакуумом.
7. Храните полученный остаток при температуре от -15 до -25 °C.

ВЭЖХ очистка олигонуклеотида

1. • Растворите олигонуклеотид из секции 3.3 в 1 мл воды двойной дистилляции.
• Профильтруйте раствор, используя 0,45 мкм мембранный фильтр.
• Нанесите на колонку Моно Q.
2. Условия ВЭЖХ:
Буферный раствор А Гидроксид натрия (10 мМ/л; pH~12),
Буферный раствор В 1 М хлорида натрия растворенного в гидроксиде натрия (10 мМ; pH~12)

Градиент в течение 50 минут от 30%-ого буфера В до 100%-ого буфера В,
Поток 1 мл/минута
Детекция в 260 нм
Типичный профиль вымывания ВЭЖХ показан на Рис. 2.
3. Начинайте градиент по истечении 2 минут.
4. Первый небольшой пик появляется при достижении 34 % буферного раствора В, - это означает наличие незначительного количества неопределенной примеси.
5. При достижении 50 – 58 % буферного раствора В, появляются дальнейшие пики, которые говорят о наличии меченых олигомеров.
6. Когда достигается примерно 62 % буферного раствора В, появляется основной пик, который означает ожидаемый продукт.
! Согласно принципу ионо-обменной хроматографии последний пик всегда соотносится с продуктом полной длины.
7. Соберите фракцию с главного пика (этап 6).
8. Продолжите процесс, пока буферный раствор В не достигнет 100 %.
9. Промойте колонку 100% буферным раствором В в течение 3 минут для осуществления регенерации.
10. • Обессольте раствор 7 этапа при помощи гелевой фильтрации или диализа.
• Лиофилизируйте обессоленный раствор.
11. Получившийся осадок храните при температуре от -15 до -25 °C.

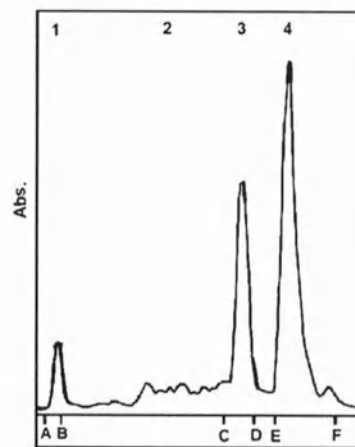


Рис. 2: Типичный профиль элюции ВЭЖХ 22-мерного олигонуклеотида (А: начальный градиент 30 % буферным раствором В; В: градиент 35 % буферным раствором В; С: градиент 50 % буферным раствором В; D: градиент 58 % буферным раствором В; E: градиент 62 % буферным раствором В; F: 100% буферным раствором В). Пик 1 показывает неопределенные примеси, пики 2 и 3 представляют маломеры, а пик 4 - внутренне меченый олигонуклеотид (раствор немного желтоватого цвета).

Контроль качества олигонуклеотида, очищенного при помощи ВЭЖХ.

1. • Растворите осадок (из секции 3.4) в 1 мл воды двойной дистилляции.
• Добавьте 40 мл раствора в кювету с 760 мл буферного раствора 1 М бората натрия (pH 8.5).
• Измерьте экстинкцию при 260 нм.
2. Увеличение значения экстинкции фактором 20-ти дает выход продукта в единицах A_{260} (одна единица A_{260} соответствует приблизительно 5 нмоль 20-мерного олигонуклеотида).
! При осуществлении синтеза 0,2 мкмоль олигонуклеотида, выходит примерно 10-25% очищенного меченого олигонуклеотида, что соответствует 20 – 50 нмоль для 20-мера.
3. Получившийся осадок храните при температуре от -15 до -25 °C.
4. Измерьте спектр поглощения UV/VIS в диапазоне 200 – 600 нм. Получающийся спектр должен соответствовать графику, приведенному ниже:

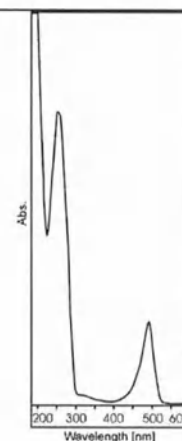


Рис. 3: Спектр поглощения UV/VIS.

5. Основываясь на спектре поглощения UV/VIS, вычислите соотношения значений экстинкции при 495 и 260 нм. В зависимости от длины и последовательности олигонуклеотидов, приблизительные значения указаны ниже:

Длина олигонуклеотидов	Отношение (A_{495}/A_{260})
20-мерный	0,20–0,30
25-мерный	0,17–0,20
30-мерный	0,15–0,17

3. Дополнительные сведения о продукте.

Теоретическая информация.

Формат детекции SimpleProbe использует единственный, флуоресцентно меченый зонд, который разработан для гибридизации с целевой последовательностью, содержащей интересующий нас SNP. Сразу после ПЦР, амплифицированный продукт денатурируют и быстро охлаждают, позволяя зонду SimpleProbe гибридизоваться с комплементарной ему последовательностью-мишенью. После гибридизации, зонд SimpleProbe испускает более интенсивный флуоресцентный сигнал, чем тот, который он выпускает, если гибридизации не произошло. При низких температурах флуоресцентный сигнал от гибридизованных зондов высокий из-за большого количества зондов, гибридизованных с последовательностью-мишенью. По мере постепенного увеличения температуры реакции, зонд SimpleProbe плавится при достижении температуры плавления (T_m) зонда, вызывая уменьшение флуоресцентного сигнала. Таким образом, изменения во флуоресцентном сигнале зависят исключительно от статуса процесса гибридизации зондов. Мутации, такие как SNP, ослабляют способность зондов SimpleProbe к связыванию, заставляя зонд отплавляться от мишени при более низкой T_m , по сравнению с последовательностью дикого типа. Поэтому, зонды SimpleProbe являются превосходным инструментом для обнаружения SNP-генотипов и мутаций, так как они четко идентифицируют дикий тип, мутанта, и гетерозиготные образцы при помощи одного быстрого исследования.

4. Дополнительная информация

4.1 Условные обозначения.

Условные обозначения по тексту

Чтобы сделать информацию последовательной и запоминающейся, в данном листке-вкладыше используются следующие условные обозначения:

Условные обозначения по тексту	Значение
Нумерованные инструкции, маркированные 1, 2 и т.д.	Этапы проведения процесса, которые обычно выполняются в указанной последовательности
Нумерованные инструкции, маркированные I, II и т.д.	Этапы проведения процесса, которые должны выполняться в указанной последовательности
Звездочка *	Обозначает продукт, поставляемый компанией Roche Applied Science

Символы

В данном листке-вкладыше для выделения наиболее важной информации используются следующие условные обозначения:

Символ	Значение
I	Информационное примечание: дополнительная информация о текущей теме или процедуре.
NB	Важное примечание: информация, необходимая для успешного осуществления процесса или использования продукта.

4.2 Сокращения.

В данной инструкции, используются следующие сокращения:

Сокращение	Значение
ABS	поглощение
CPG	стекло с регулируемой пористостью
IEX	ионный обмен
SNP	Полиморфизм одиночного нуклеотида
UV	ультрафиолетовый свет
VIS	видимый свет

4.3 Информация о заказе

Roche Applied Science предлагает большой выбор реактивов и систем для проведения исследований в рамках наук о жизни. Для получения более полной информации о других подобных продуктах и руководствах, пожалуйста, посетите и внесите в закладку нашу домашнюю страницу, <http://www.roche-applied-science.com>, и наши Корпоративные Сайты, в том числе:

- Системы реального времени ПЦР (LightCycler® Carousel-based System,

- LightCycler® 480 System, and Universal ProbeLibrary):
<http://www.lightcycler-online.com>

- Системы LightTyper для определения генотипов:
<http://www.lighttyper.com>

Продукт	Комплектация	Кат №
LightCycler® 2.0 Instrument	1 прибор с аксессуарами	03 351 414 001
LightCycler® 1.5 Instrument	1 прибор с аксессуарами	04 484 495 001
	1 прибор (96 лунок)	04 640 268 001
LightCycler® 480 Instrument	1 прибор (384 лунок)	04 545 885 001

Продукт	Комплектация	Кат №
LightTyper Instrument	1 прибор (96 лунок) 1 прибор (384 лунок)	03 357 406 001 03 357 414 001
LightCycler® Probe Design Software 2.0	1 комплект программного обеспечения	04 342 054 001
LightCycler® Software 4.05	1 комплект программного обеспечения	04 717 392 001
LightCycler® Red 640-Nhydroxysuccinimide ester	1 пузырек	12 015 161 001
LightCycler® Red 610-Nhydroxysuccinimide ester	1 пузырек	03 561 488 001
LightCycler® Fluorescein CPG	1 г 5 колонок	03 138 178 001 03 113 906 001

Вниманию покупателя

Этот продукт может быть продан только с целью его использования самим покупателем. Продажа, и распространение данного продукта, а также передача полученного из данного продукта вещества третьему лицу строго запрещены. В особенности недопустима продажа олигонуклеотидов, а также любых других продуктов, меченных ими. Технология, используемая в системах LightCycler® Carousel-based System and LightTyper System, лицензирована от имени компании Idaho Technology Inc, Город Солт Лэйк Сити, Юта, США. Покупка этого продукта подразумевает выдачу Покупателю лицензии на ограниченное использование, запрет на передачу и конечное использование Технологии SimpleProbe, описанную в Патенте США № US 6 635 427, а также в копиях иностранных патентов, принадлежащих Idaho Technology.

Торговые марки

LIGHTCYCLER, LIGHTTYPER, и SIMPLEPROBE являются торговыми марками компании Roche. MOHO Q - Торговая марка Amersham Pharmacia Biotech AB, SE-751 84 Упсала, Швеция.

Контактная Информация и Поддержка

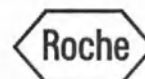
Если Вы хотите задать вопросы, разобраться с возникшими трудностями, предложить программы усовершенствования или сообщить о новых способах применения препарата, пожалуйста, посетите наш сайт **Технической Поддержки On-line**:

www.roche-applied-science.com/support

Если Вы хотите нам позвонить, написать, отправить факс или отправить электронное письмо посетите домашнюю страницу the Roche Applied Science: www.roche-applied-science.com и выберите страну проживания.

Вы увидите контактную информацию, актуальную для конкретной страны.

Используйте функцию Поиск Продукта, чтобы найти Листки-Вкладыши и Паспорта Безопасности Вещества.



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Маннхайм
Германия



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Рош-Москва»

М. Петрович

«02» апреля 2009г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Флуоресцентный краситель ResoLight (LightCycler 480 ResoLight Dye)

Для лабораторных исследований.
Не рекомендуется использовать в диагностических целях.
ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *IN VITRO*.



Флуоресцентный краситель ResoLight LightCycler® 480 ResoLight Dye

Флуоресцентный краситель для детекции двухцепочечной ДНК при проведении ПЦР в реальном времени и анализе кривых плавления высокого разрешения.

Версия Февраль 2008

Хранить при температурах от -15 до -25°C.

Кат. №. 04 909 640 001

1 мл



Хранить в защищенном от света месте!

1. Назначение данного продукта

Содержание набора

1 виал содержит 1 мл 20х конц. раствора красителя. Набор рассчитан на 1000 реакций с конечным объемом одной реакции равным 20 мкл.

Хранение и стабильность

Продукт стабилен при температуре от -15 до -25°C до истечения срока годности, указанного на маркировке.



Краситель транспортируется в сухом льду.



Избегайте повторные замораживания и размораживания. После размораживания, храните в аликвотах при температуре от -15 до -25°C.



Храните в защищенном от света месте.

Необходимые дополнительные реагенты

Необходимые дополнительные реагенты для постановки ПЦР-реакций с флуоресцентным красителем ResoLight в системе LightCycler® 480:

- Прибор LightCycler® 480
- 384/96-луночный планшет для прибора LightCycler® 480 вместе со специальной запечатывающей пленкой LightCycler® 480 Sealing Foil*
- Стандартная бакет-ротаторная центрифуга с ротором для многолуночных планшетов с соответствующими адапторами.

Область применения

Краситель LightCycler® 480 ResoLight Dye связывается с двухцепочечной ДНК и обеспечивает гомогенное измерение формирования ДНК при проведении ПЦР в реальном времени, а также, гомогенное измерение диссоциации двухцепочечной ДНК при проведении анализа кривой плавления. Он специально разработан для детекции различных последовательностей во время анализа кривых плавления высокого разрешения с помощью различий в кривых плавления при поиске мутаций или при генотипировании. Краситель LightCycler® 480 ResoLight Dye в меньшей степени ингибирует ДНК-полимеразу и создает более высокий сигнал флуоресценции в отличие от обычно используемых красителей для детекции двухцепочечной ДНК. Краситель ResoLight имеет схожие с флуоресцентом длины волн возбуждения и излучения (эмиссии) и может быть использован для детекции на большинстве подходящих для ПЦР в реальном времени приборах. Система LightCycler® 480 вместе с ее специальными техническими данными позволяет распознавать вариации (генетическую изменчивость) последовательности при проведении анализа кривой плавления высокого разрешения.

2. Работа с данным продуктом

Характеристики:

Краситель LightCycler® 480 ResoLight Dye возбуждается светом при длине волны равной 450-500 нм. Максимум возбуждения происходит при 487 нм. Излучение (эмиссия) может быть измерено при 480-560 нм. Максимум излучения происходит при 503 нм.

Методика проведения

Используйте нижеприведенную таблицу для приготовления Вашего мастер микса, содержащего краситель ResoLight.

1	Разморозьте краситель LightCycler® ResoLight Dye.
2	Добавьте 1 часть красителя LightCycler® ResoLight Dye к 19 частям Вашей реакционной смеси для ПЦР.

3. Дополнительная информация о продукте

Контроль качества

Краситель LightCycler® ResoLight Dye прошел все испытания в системе LightCycler® 480 для ПЦР в реальном времени.

4. Вспомогательная информация

Текстовые обозначения

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

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

Символы

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

Изменения относительно предыдущей версии

Редакторские изменения

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 для ПЦР в реальном времени (система LightCycler® карусельного типа, система LightCycler® 480 и универсальная библиотека зондов): www.lightcycler.com
- Количественный ПЦР в реальном времени с зондами из Универсальной библиотеки зондов: <http://www.universalprobelibrary.com>

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Приборы и аксессуары	Прибор LightCycler® 480-II, 96-луночный	1 прибор с системным блоком и аксессуарами	05 015 278 001
	Прибор LightCycler® 480-II, 384-луночный	1 прибор с системным блоком и аксессуарами	05 015 243 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 96-луночный планшет	50 планшетов с запечатывающими пленками	04 729 692 001
	LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 384-луночный планшет	50 планшетов с запечатывающими пленками	04 729 749 001
	LightCycler® 480 Gene Scanning Software (Программное обеспечение для сканирования генов)	1 пакет программ	05 103 908 001
Наборы LightCycler® для ПЦР	LightCycler® 480 Probes Master (Набор реагентов для ПЦР-анализа с гидролизными зондами)	5 x 1 мл (5 X 100 реакций, 20 мкл каждая) 10 x 5 мл (10 X 500 реакций, 20 мкл каждая) 1 x 50 мл (5000 реакций, 20 мкл каждая)	04 707 494 001 04887 301 001 04 902 343 001

	Продукт	Комплектация	Кат.№
Универсальная библиотека зондов	LightCycler® RNA Master Hydrolysis Probe (Набор реагентов для ПЦР-анализа РНК с гидролизными зондами)	5 X 100 реакций (20 мкл каждая)	04 991 885 001
	LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Набор реагентов для анализа кривых плавления высокого разрешения)	1 набор 5 X 100 реакций (20 мкл каждая)	04 909 631 001
	Universal ProbeLibrary Set, Human (Набор универсальной библиотеки зондов, человек)	Библиотека из 90 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции	04 683 633 001
	Universal ProbeLibrary Extension Set (Набор универсальной библиотеки зондов, дополнительный)	Дополнительная Библиотека из 75 превалидированных (предварительно проверенных) зондов для детекции (зонды с #91 до #165)	04 869 877 001

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ПОКУПАТЕЛЮ: ОГРАНИЧЕНИЯ, НАЛАГАЕМЫЕ ЛИЦЕНЗИЕЙ

Лицензия не покрывается при покупке данного продукта, лицензированного по US Patents Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375, 5,994,056, 6,171,785, 6,214,979, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569 и соответствующим патентным притязаниям вне территории США или другим патентам или заявкам на патент, имеющим отношение к 5'-нуклеазному процессу и процессу связывания красителя с двухцепочечной ДНК (5' Nuclease and dsDNABinding Dye Processes). Дополнительную информацию можно получить у директора по лицензированию - Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Торговые марки

LIGHTCYCLER и LC являются торговыми марками Roche.

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. Используйте опцию "Product Search" для поиска вкладышей к наборам и сведений о безопасности продукта.



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany