



dsGreen Lyophilized qPCR Kit manual

Contents

English: dsGreen Lyophilized qPCR Kit manual	3-6
Deutsch: dsGreen lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch	7-10
Русский: Инструкция к набору dsGreen для кПЦР лиофилизированный	11-14

dsGreen Lyophilized qPCR Kit manual

dsGreen lyophilized qPCR kit is designed to determine the precise content of the DNA matrix in the test sample. It is applicable for gene copy number detection, gene expression analysis, and genotyping using the Real-Time qPCR (RT-qPCR) method. The kit contains hot start (HS) polymerase, which prevents nonspecific amplification. It uses intercalating dye **dsGreen** for detection.

dsGreen lyophilized qPCR kit reaction mix does not contain ROX reference dye; thus, it is compatible with any real-time DNA amplifier. A reaction mixture volume of 1 mL is good for 100 rxn of 20 μ L.

Kit components

Kit component	Count
	32162 100 reactions
31315, Lyophilized Taq polymerase composition with hot start, 100 rxn	1
51215, Polymerase reconstitution buffer, 1 mL	1
11010, dsGreen for Real-Time PCR, 100 \times , 100 μ L	1

Transportation: at room temperature for up to 3 weeks. Store at -20 °C.

Shelf life 12 months.

Compatibility with equipment: compatible with any thermocyclers.

Protocol

1. Dissolve **HS Taq polymerase** (Component #1) in **Polymerase reconstitution buffer** (Component #2). For this, add the whole volume of the Component #2 vial into the Component #1 vial. Resuspend carefully and wait until completely dissolved (~5 minutes).
2. Add 20 μL **dsGreen for Real-Time PCR, 100x** (Component #3) in the vial. Carefully mix the resulting blend, and spin down the solution using centrifuge.

Important! After preparing and dsGreen dye adding, store the reaction mixture at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Prepare a reaction mixture according to the table in the proportion per $(N+0.1N)$ reactions, where N is the required number of reactions. Add components in the given order. Carefully vortex the resulting blend, and spin down the solution using centrifuge.

Important! The volume of the reaction solution may vary depending on the specific application, but a volume of less than 10 μL is not recommended.

Calculations for the total volume 20 μL per single reaction:

The reaction components should be recalculated with the proportion below when using a different reaction volume.

Component	Volume	Note
2x Reaction mix	10 μL	—
Forward primer	0.5–1.5 μL 10 μM solution	5–15 pmol/reaction (final concentration 250–750 nM)
Reverse primer	0.5–1.5 μL 10 μM solution	
Deionized water	Is added to bring to the reaction volume of 20 μL	
DNA	2–9 μL (cDNA, 50–100 ng genomic DNA, 1–100 pg plasmid DNA)	Is added separately in each vial (see step 4)
The total volume of reaction	20 μL	

4. Add the final volume of the reaction mixture in separate PCR tubes without taking into account the volume of the DNA sample. Add DNA samples to each PCR tube, and spin down the solution using centrifuge.

Important! *To obtain reliable and reproducible data, run the PCR reaction at least two times for each DNA sample.*

Amplification program

Use the standard method to calculate the primers' melting point (T_m) using Nearest-Neighbor algorithm (SantaLucia J. Jr., 1998). The primer annealing temperature is determined according to the equation: $T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$.

If the annealing temperature of the primers $\geq 60\text{ }^\circ\text{C}$:

Stage	Temperature	Time	Number of cycles
HS Taq polymerase activation	95 °C	5 minutes	1
Denaturation	95 °C	10 seconds	40
Primers annealing combined with elongation (Fluorescence detection should be performed at this stage)	60–72 °C	30–60 seconds	

If the annealing temperature of the primers $< 60\text{ }^\circ\text{C}$:

Stage	Temperature	Time	Number of cycles
HS Taq polymerase activation	95 °C	5 minutes	1
Denaturation	95 °C	10 seconds	40
Primers annealing (Fluorescence detection should be performed at this stage)	55–59 °C	10–15 seconds	
Elongation	72 °C	15–30 seconds	

Important! After amplification, we recommend performing amplicon melting in a range from 60 up to 95 °C to ensure the absence of nonspecific amplification.

dsGreen lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch

Das **dsGreen lyophilisierte qPCR-Kit** wurde entwickelt, um den genauen der DNA-Matrix in der Testprobe zu bestimmen. Es ist für die Erkennung der Genkopienzahl, die Genexpressionsanalyse und die Genotypisierung mit der Real-Time-qPCR (RT-qPCR)-Methode geeignet. Das Kit enthält Hot Start (HS)-Polymerase, die eine unspezifische Amplifikation verhindert. Zur Detektion wird der interkalierende **Farbstoff dsGreen** verwendet.

dsGreen lyophilisierte qPCR-Kit-Reaktionsmischung enthält keinen ROX-Referenzfarbstoff; daher ist es mit jedem Echtzeit-DNA-Verstärker kompatibel. Ein Volumen der Reaktionsmischung von 1 ml ist genug für 100 rxn von 20 µl.

Bestandteile

Komponente	Anzahl
	32162 100 Reaktionen
31315, Lyophilisierte HS-Taq-Polymerase-Zusammensetzung, 100 rxn	1
51215, Polymerase-Rekonstitutionspuffer, 1 mL	1
11010, dsGreen für Echtzeit-PCR, 100×, 100 µL	1

Transport: bei Raumtemperatur bis zu drei Wochen. Lagerungsbedingungen: bei -20 °C.

Haltbarkeit: 12 Monate.

Kompatibilität mit Geräten: Kompatibel mit allen Thermocyclern.

Protokoll

1. Lösen Sie HS Taq-Polymerase (Komponente Nr. 1) in Polymerase-Rekonstitutionspuffer (Komponente Nr. 2). Dafür fügen Sie das gesamte Volumen des Röhrchens mit Komponente Nr. 2 in das Röhrchen mit Komponente Nr. 1 hinzu. Vorsichtig resuspendieren und warten, bis es vollständig aufgelöst ist (5 Minuten).
2. Geben Sie 20 μl dsGreen für Real-Time PCR, 100x (Komponente Nr. 3) in das Röhrchen. Mischen Sie die entstandene Mischung sorgfältig und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

Wichtig! Lagern Sie die Reaktionsmischung nach der Vorbereitung und Zugabe des dsGreen-Farbstoffs bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Bereiten Sie eine Reaktionsmischung gemäß der Tabelle im Verhältnis pro (N+0,1N) Reaktionen vor, wobei N die erforderliche Anzahl von Reaktionen ist. Fügen Sie die Komponenten in der angegebenen Reihenfolge hinzu. Mischen Sie gut mit einem Wirbelschüttler und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

Wichtig! Das Volumen der Reaktionslösung kann je nach Anwendung variieren, ein Volumen von weniger als 10 μl wird jedoch nicht empfohlen.

Berechnungen für das Gesamtvolumen 20 μl pro Einzelreaktion:

Bei Verwendung eines anderen Reaktionsvolumens sind die Reaktionskomponenten anteilig, wie unten angezeigt umzurechnen.

Komponente	Volumen	Notiz
2x Reaktionsgemisch	10 μl	—
Forward Primer	0,5–1,5 μl 10 μM Lösung	5–15 pmol/Reaktion (Endkonzentration 250–750 nM)
Reverse Primer	0,5–1,5 μl 10 μM Lösung	
Deionisiertes Wasser	Wird zugegeben, um das Reaktionsvolumen auf 20 μl anfüllen	

DNA	2–9 μ l (cDNA, 50–100 ng genomische DNA, 1–100 pg Plasmid-DNA)	Wird separat in jedes Röhrchen gegeben (siehe Schritt 4)
-----	--	---

Das Gesamtvolumen der Reaktion**20 μ l**

- Fügen Sie das endgültige Volumen der Reaktionsmischung ins separate PCR-Röhrchen hinzu, ohne das Volumen der DNA-Probe zu berücksichtigen. Fügen Sie jedem PCR-Röhrchen DNA-Proben hinzu und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

Wichtig! *Um zuverlässige und reproduzierbare Daten zu erhalten, führen Sie die PCR-Reaktion für jede DNA-Probe mindestens zweimal durch.*

Amplifikationsprogramm

Verwenden Sie die Standardmethode, um den Schmelzpunkt des Primers (T_m) mit dem Nearest-Neighbor-Algorithmus (SantaLucia J. Jr., 1998) zu berechnen. Die Primer-Annealing-Temperatur wird nach folgender Gleichung bestimmt: $T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$.

Wenn die Annealingtemperatur der Primer $\geq 60\text{ }^\circ\text{C}$:

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HS-Taq-Polymerase	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	40
Primer-Annealing kombiniert mit Elongation (zu diesem Zeitpunkt sollte eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden)	60–72 °C	30–60 Sekunden	

Wenn die Annealingtemperatur der Primer $< 60\text{ }^\circ\text{C}$:

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HS-Taq-Polymerase	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	40
Primer-Annealing (Fluoreszenzdetektion sollte zu diesem Zeitpunkt durchgeführt werden)	55–59 °C	10–15 Sekunden	
Verlängerung	72 °C	15–30 Sekunden	

Wichtig! Nach der Amplifikation wird empfohlen, das Schmelzen der Amplikons in einem Bereich von 60 bis 95 °C durchzuführen, um sicherzustellen, dass keine unspezifische Amplifikation stattfindet.

Инструкция к набору dsGreen для кПЦР лиофилизированный

Набор для кПЦР dsGreen лиофилизированный применяется для точного определения содержания ДНК матрицы в пробе и подходит для определения копийности и уровня экспрессии генов, а также генотипирования методом кПЦР. Для детекции в наборе используется интеркалирующий краситель dsGreen структурный .

Реакционная смесь в наборе не содержит референсный краситель ROX, что позволяет её использовать с real-time амплификаторами любого типа.

Полимераза с технологией «горячего старта», входящая в состав набора, предотвращает неспецифическую амплификацию ДНК. Объём смеси 1 мл рассчитан на проведение 100 реакций объёмом 20 мкл.

Состав набора

Компонент набора	Количество
	32162
	100 реакций
31315, Лиофилизированная полимеразы Taq с горячим стартом, 100 гкл	1
51215, Буфер для растворения полимеразы, 1 mL	1
11010, dsGreen для ПЦР реального времени, 100×, 100 µL	1

Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре. Хранение: при -20°C.

Срок хранения 12 месяцев.

Совместимость с оборудованием: совместим с real-time амплификаторами любого типа.

Протокол

1. Растворите **лиофилизированную смесь** (Компонент #1) **буфером для ресуспендирования** (Компонент #2). Для этого добавьте весь объём **буфера для ресуспендирования** (Компонент #2) в пробирку с **лиофилизированной смесью** (Компонент #1). Тщательно перемешайте и дождитесь полного растворения фермента (~5 минут).
2. Добавьте в пробирку 20 мкл **dsGreen для ПЦР реального времени, 100x** (Компонент #3). Тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.

Важно! *Храните реакционную смесь после растворения и добавления красителя dsGreen в морозильной камере (-20°C).*

3. Смешайте компоненты реакции согласно приведённой ниже таблице в указанной последовательности из расчёта на (N+0,1N) реакций, где N — необходимое число реакций. Готовую смесь перемешайте на вортексе и сбросьте капли центрифугированием.

Важно! *Объём реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объём реакции менее 10 мкл не рекомендуется.*

Расчет на 1 реакцию объёмом 20 мкл:

При использовании другого объёма реакции следует пересчитать объёмы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций.

Компонент	Объём	Примечание
2x Реакционная смесь	10 мкл	—
Прямой праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 250–750 нМ)
Обратный праймер	0.5–1.5 мкл 10 мкМ раствора	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объёма реакции 20 мкл	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.4)

Общий объём реакции 20 мкл

4. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объёма образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.

Важно! Для получения воспроизводимых результатов реакцию рекомендуется ставить в двух и более повторах для каждого образца ДНК.

Программа амплификации

Для расчёта температуры плавления (T_m) праймеров рекомендуется использовать стандартные инструменты, работающие по алгоритму Nearest-Neighbor (SantaLucia J. Jr., 1998). Температура отжига праймеров рассчитывается по формуле $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$.

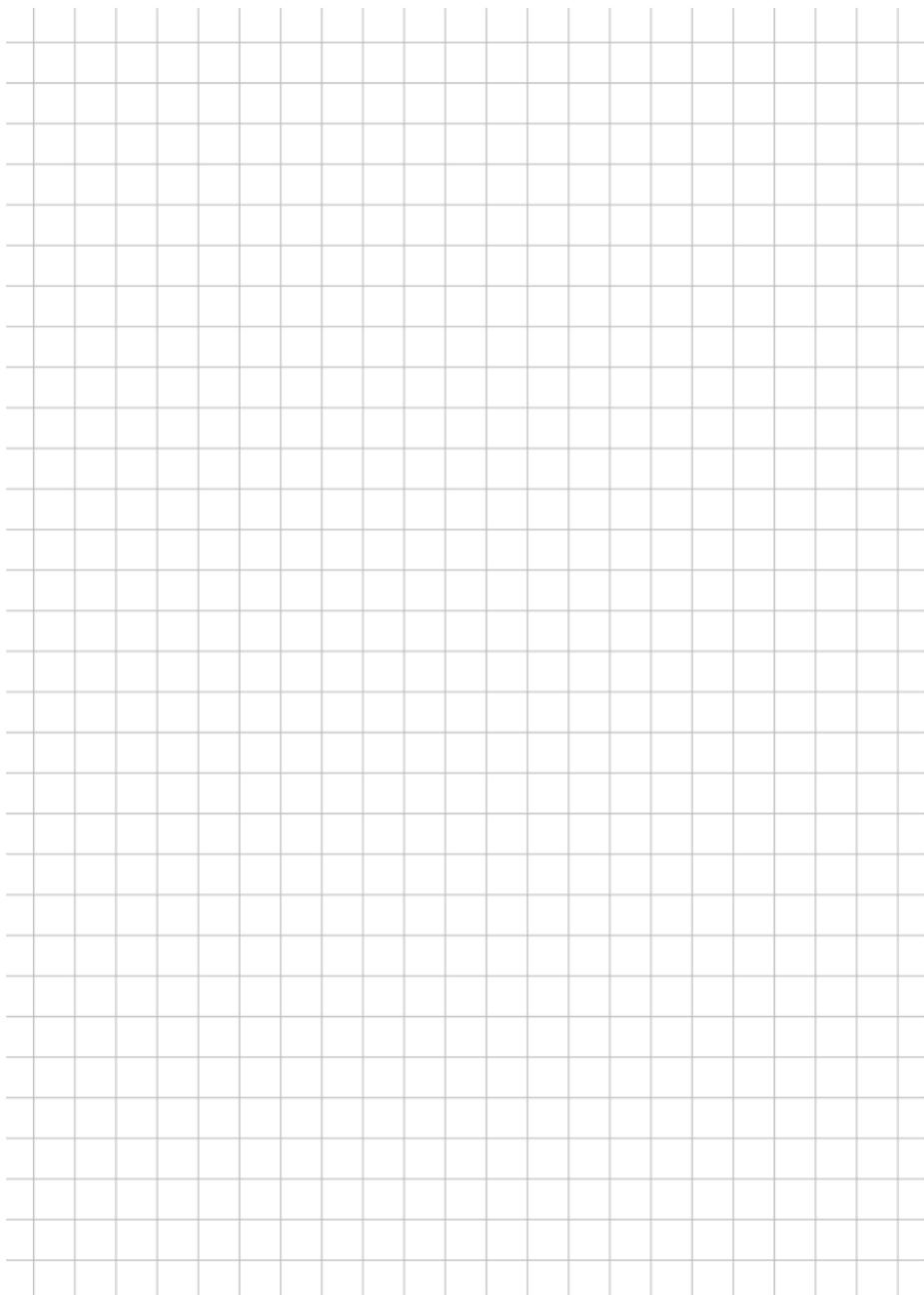
Если температура отжига праймеров $\geq 60^\circ\text{C}$:

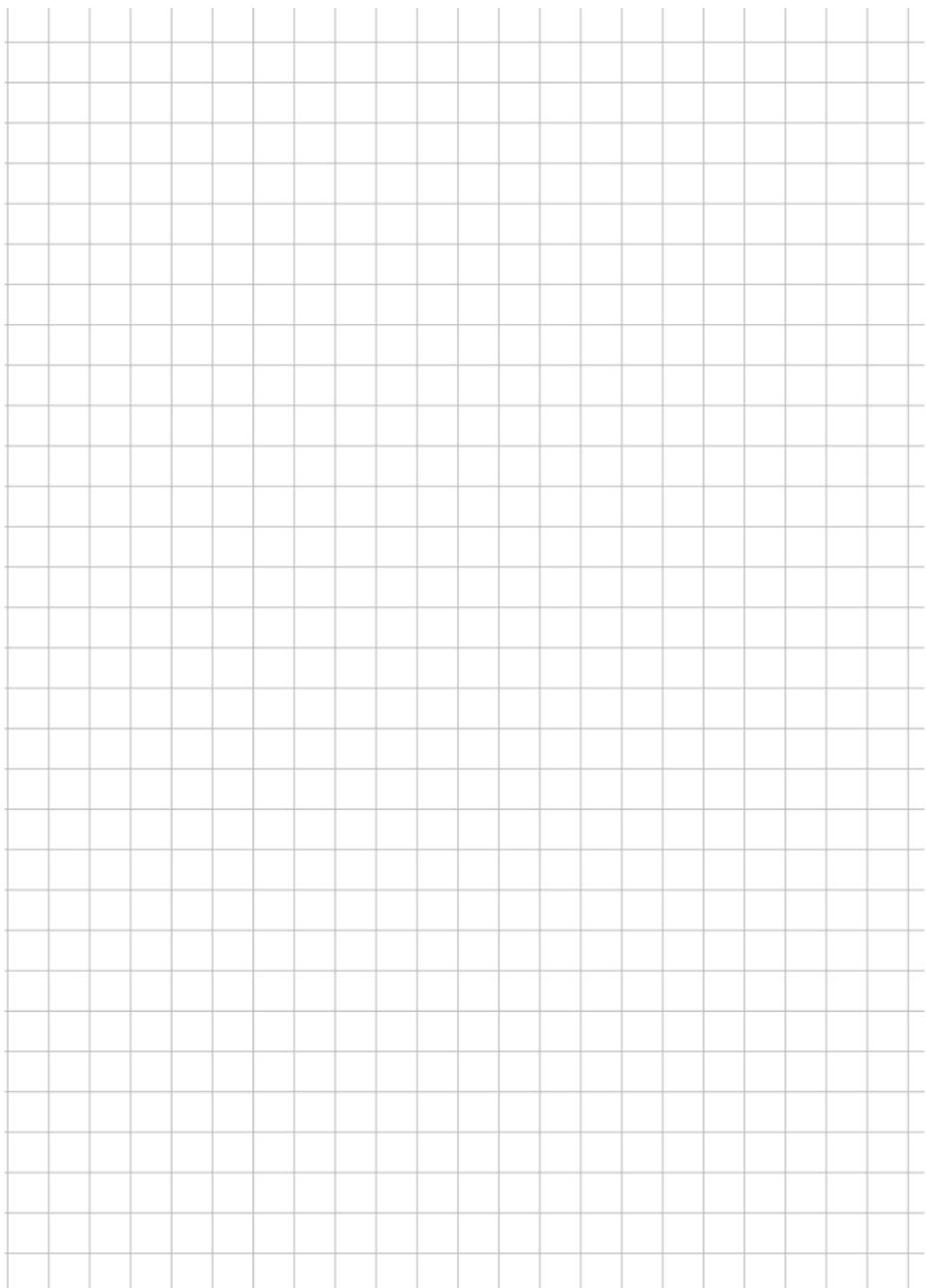
Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	40
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	$60\text{--}72^\circ\text{C}$	30–60 сек	

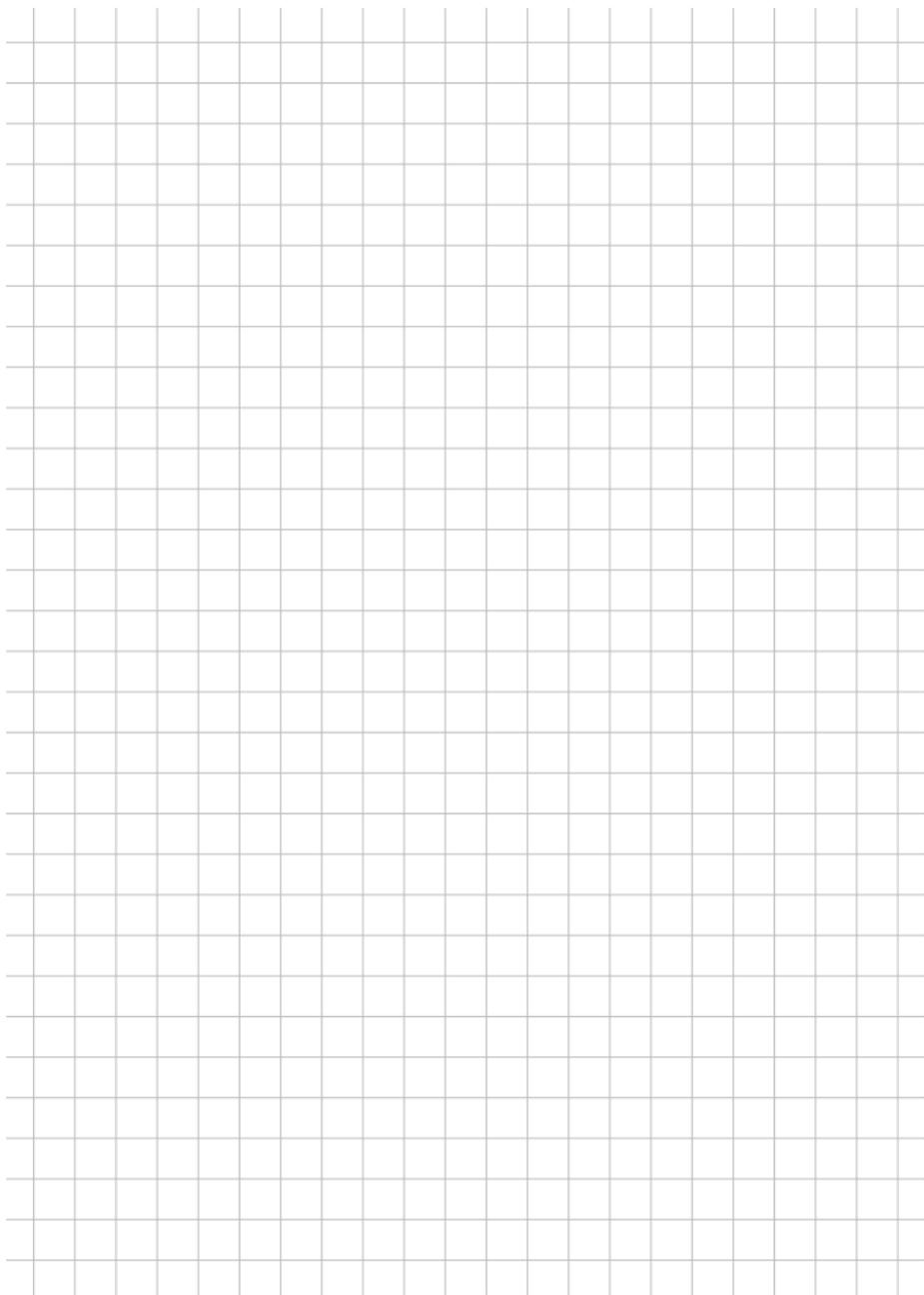
Если температура отжига праймеров $< 60^\circ\text{C}$:

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	40
Отжиг праймеров (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	$55\text{--}59^\circ\text{C}$	10–15 сек	
Элонгация	72°C	15–30 сек	

Важно! После проведения амплификации, для того чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95°C .









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

