

## Амплификация ДНК с реакционной смесью для ПЦР ProbeMaster® GEL UDG, 5×

ProbeMaster® GEL UDG — готовая 5-кратная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения ПЦР с дальнейшей детекцией результатов методом электрофореза. Ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации. Благодаря высокой плотности смеси и наличию в ней красителей (бромфенолового синего и ксиленианола), образец перед нанесением на гель не нужно смешивать с буфером для нанесения. Наличие двух красителей позволяет четко контролировать время электрофореза.

Реакционная смесь ProbeMaster® GEL UDG подходит для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Урацил-ДНК-гликозилаза при этом исключает контаминацию ампликонами от предыдущих реакций и получение ложноположительных результатов, что особенно актуально при проведении электрофореза ампликонов. Из-за содержания dUTP смесь не подходит для задач, в которых необходимо использовать в дальнейшем продукты амплификации. Для таких задач мы рекомендуем использовать наш продукт ProbeMaster® GEL.

### Состав реакционной смеси:

- HS Taq ДНК-полимераза;
- урацил-ДНК-гликозилаза (UDG);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (включая dUTP);
- ПЦР-буфер (содержит  $Mg^{2+}$  с концентрацией 3 мМ в 1× реакционной смеси);
- красители для нанесения на гель.

### Ключевые характеристики смеси:

- Объем 5-кратной смеси 500 мкл рассчитан на проведение 100 реакций по 25 мкл.
- Смесь полностью готова к работе. Для постановки реакции в смесь необходимо добавить только образец ДНК, праймеры и воду, что значительно экономит время на постановку реакции.
- Урацил-ДНК-гликозилаза исключает контаминацию ампликонами от предыдущих реакций и получение ложноположительных результатов, что особенно актуально при проведении электрофореза ампликонов.
- Подходит для ПЦР фрагментов длиной до 3 тыс. п.о., не более 70% GC, не требующих высокоточной амплификации.
- В качестве матрицы может использоваться геномная, вирусная, плазмидная ДНК и др., а также кДНК, полученная при обратной транскрипции.
- Содержит высокопроцессивную Hot-Start Taq-полимеразу с активацией 5 мин при 95°C. Используемая HS Taq ДНК-полимераза представляет собой комплекс моноклональных антител с ферментом. Прогрев образца в первом цикле ПЦР приводит к инактивации антител в составе комплекса и активирует фермент. Технология «горячего старта» позволяет предотвратить неспецифическую амплификацию и образование димеров праймеров.

- Состав и плотность смеси оптимизированы для непосредственного нанесения образца на агарозный гель после завершения амплификации.
- Благодаря входящим в состав смеси красителям образцы легко наносить на агарозный гель. Наличие двух красителей (бромфенолового синего и ксиленианола) позволяет четко контролировать время электрофореза.

## Возможные приложения:

ПЦР с детекцией продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза, ПЦР после обратной транскрипции.

## Совместимость с оборудованием

Совместима с амплификаторами любого типа.

## Протокол

1. Разморозьте реакционную смесь, тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием.
2. 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 и сбросьте капли центрифугированием.

### Расчет на 1 реакцию объемом 25 мкл\*:

Компонент	Объем	Примечание
Реакционная смесь, 5×	5 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 объема реакции 25 мкл*	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.3)
<b>Общий объём реакции</b>	<b>25 мкл*</b>	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

\* Объем реакции можно менять в зависимости от конкретной задачи, однако работать с объемом реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

- В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.
- Проведите амплификацию ДНК с использованием приведенных программ (температура отжига праймеров рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров).

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

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

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

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

- Проанализируйте результаты ПЦР методом гель-электрофореза. Для нанесения образцов в лунки геля добавление в пробу буфера для нанесения не требуется.

*Для детекции продуктов амплификации на агарозном геле используйте бромистый этидий или более чувствительные и менее токсичные красители [dsGreen](#) и [dsSafe](#).*

- При необходимости хранить продукты амплификации при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Условия хранения

- Транспортировка/Хранение: при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$  — 12 месяцев в пределах срока годности. При температуре от 0 до  $+25^{\circ}\text{C}$  — 5 дней в пределах срока годности.
- Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки, если иное не указано в паспорте товара.