

Амплификация ДНК с лиофилизированными шариками DryDrops® PCR UDG

Ллиофилизированные шарики DryDrops®UDG — предварительно приготовленная и расфасованная форма реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Урацил-ДНК-гликозилаза исключает контаминацию ампликонами от предыдущих реакций и получение ложноположительных результатов. Каждый лиофилизированный шарик для ПЦР представляет собой сухую гранулу, содержащую готовую реакционную смесь со всеми необходимыми компонентами, для проведения ПЦР объемом 25 мкл.

Состав реакционной смеси оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации. DryDrops обеспечивают большую воспроизводимость между реакциями за счет минимизации этапов приготовления реакционной смеси и снижения вероятности ошибок при приготовлении смеси и контаминации образцов. Каждая партия DryDrops проходит функциональное тестирование для обеспечения воспроизводимости от партии к партии.

Ллиофилизированный формат позволяет хранить готовую ПЦР-смесь до 12 месяцев при температуре до +4°C.

Состав реакционной смеси:

- Taq-полимераза с горячим стартом;
- Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (включая dUTP);
- оптимизированный буфер для ПЦР (содержит Mg²⁺ с концентрацией 3 мМ в 1× реакционной смеси);
- протекторы для лиофилизации.

Совместимость с оборудованием:

Ллиофилизированные шарики DryDrops® UDG совместимы с амплификаторами любого типа и могут быть использованы как для постановки ПЦР в амплификаторах с классическими термоблоками для ПЦР-пробирок, так и в амплификаторах с картриджами.

Возможные приложения:

DryDrops подходят для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, в том числе для количественного анализа ([с флуоресцентными зондами](#) или интеркалирующим красителем, например, [Eva488](#)); а также для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза.

Для задач по клонированию и других применений, требующих дальнейшей работы с продуктом ПЦР после амплификации мы рекомендуем использовать наш продукт [DryDrops® PCR](#), который не содержит dUTP.

Протокол

! Объем реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, но всегда должен быть кратным 25 мкл.

1. Предварительно смешайте в отдельной пробирке компоненты реакции, кроме ДНК, согласно приведенной ниже таблице, из расчёта на $(N + 0,1N)$ реакций, где N — необходимое число реакций.

Расчет на одну реакцию объемом 25 мкл с детекцией в режиме реального времени:

Компонент	Объем	Примечание
Прямой праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 200–600 нМ)
Обратный праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	
Зонд или Интеркалирующий краситель	0,25–0,75 мкл 10 мкМ раствора	2,5–7,5 пмоль/реакцию (конечная концентрация 100–300 нМ)
	Согласно рекомендации производителя	
ДНК	2–9 мкл	Добавляется в п.4 отдельно в каждую пробирку.
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема жидких компонентов реакционной смеси 24 мкл	С учетом объема образца ДНК, который будет добавлен в п.4.
Общий объем жидких компонентов реакционной смеси	24 мкл	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

Расчет на одну реакцию объемом 25 мкл с детекцией методом гель-электрофореза:

Компонент	Объем	Примечание
Прямой праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	5–15 пмоль/реакцию (конечная концентрация 200–600 нМ)
Обратный праймер	0,5–1,5 мкл 10 мкМ раствора	
ДНК	2–9 мкл	Добавляется в п.4 отдельно в каждую пробирку.
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема жидких компонентов реакционной смеси 24 мкл	С учетом объема образца ДНК, который будет добавлен в п.4.
Общий объем жидких компонентов реакционной смеси	24 мкл	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

- Чистый пинцет протрите 70% раствором этанола и высушите. Пинцетом поместите по одному шарик в каждую пробирку для ПЦР.
Внимание! Если вы используете увеличенный объем реакции необходимо положить пропорционально больше шариков в каждую пробирку для ПЦР.
- Добавьте к шарикам по 15–22 мкл приготовленной реакционной смеси из расчёта, что после добавления ДНК (2–9 мкл, п.4) общий объем без шарика должен составить 24 мкл.
- Внесите в каждую пробирку отдельным наконечником пипетки 2–9 мкл образца ДНК/кДНК (суммарно 50–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК). После добавления ДНК суммарный объем реакции должен составить 25 мкл (шарик вносит 1 мкл в объем реакции), 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°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 с	40–50
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	60–72°C		

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 с	40–50
Отжиг праймеров (На этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	55–59°C	10–15 с	
Элонгация	72°C	15–30 с	

- В случае использования интеркалирующего красителя для того, чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95°C после проведения амплификации.
- Для анализа результатов ПЦР методом гель-электрофореза: смешайте образцы с буфером для нанесения на гель и внесите их в лунки геля, проведите электрофорез.
- При необходимости продукты амплификации можно хранить при -20°C .