

Амплификация ДНК с реакционной смесью для кПЦР ProbeMaster® Lyo GEL UDG

ProbeMaster® Lyo 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 Ксиленцианола), образец перед нанесением на гель не нужно смешивать с буфером для нанесения. Наличие двух красителей позволяет четко контролировать время электрофореза.

Реакционная смесь ProbeMaster® Lyo 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® Lyo GEL](#).

Состав реакционной смеси:

- HS Taq ДНК-полимераза;
- урацил-ДНК-гликозилаза (UDG);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (включая dUTP);
- ПЦР-буфер (содержит Mg²⁺ с концентрацией 3 мМ в 1× реакционной смеси)
- красители для нанесения на гель
- Протекторы для лиофилизации.

Ключевые характеристики смеси:

- Одна пробирка лиофилизованной смеси после разведения в 450 мкл воды рассчитана на проведение 100 реакций объемом 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 Ксиленцианола) позволяет четко контролировать время электрофореза.

Возможные приложения:

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

Совместимость с оборудованием:

Совместим с амплификаторами любого типа.

Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Протокол

Перед началом работы добавьте в лиофилизированную смесь 450 мкл деионизированной воды, подождите 1 минуту, перемешайте содержимое пробирки на вортексе и сбросьте капли центрифугированием. В дальнейшем восстановленную смесь можно хранить при +4°C в течение 30 суток или заморозить и хранить в пределах срока годности при -20°C. Допускается до 5 раз замораживать/размораживать смесь после восстановления из лиофилизированной формы.

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	
Деионизированная 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.4)
Общий объем реакции	25 мкл*	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.

3. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК.
4. Внесите образцы ДНК отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.
5. 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
Отжиг праймеров, совмещенный с элонгацией**	60–72°C	30–60 с	

• Если температура отжига праймеров < 60°C

Стадия	Температура	Время	Число циклов
Активация HS Taq-полимеразы	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 с	40
Отжиг праймеров**	55–59°C	10–15 с	
Элонгация	72°C	15–30 с	

** При необходимости детекция флуоресценции должна производиться на этом этапе.

6. 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](#).

7. При необходимости хранить продукты амплификации при -20°C.

Условия хранения

- Хранение: 12 месяцев (с момента доставки) при температуре до +4°C.
- Транспортировка: до 21 суток при температуре до +25°C.
- После восстановления в жидкую форму – хранить при +4°C до 30 суток или при -20°C в пределах срока годности. Продукт в жидкой форме не теряет функциональных свойств после 5 циклов заморозки-разморозки.