

Амплификация ДНК с реакционной смесью для кПЦР ProbeMaster® Lyo UDG

ProbeMaster® Lyo UDG — лиофилизированная реакционная смесь, включающая все необходимые компоненты для проведения ПЦР. Ее состав, содержащий Hot-start полимеразу, оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации. Урацил-ДНК-гликозилаза в составе смеси исключает контаминацию ампликонами от предыдущих реакций и получение ложноположительных результатов.

Смесь ProbeMaster® Lyo UDG подходит как для проведения количественной ПЦР, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. В случае постановки реакции ПЦР в режиме реального времени, для детекции флуоресценции следует использовать ДНК-зонд, меченный флуорофором и тушителем (гидролизующие зонды, «молекулярные маяки», праймеры типа «скорпион») или два зонда, меченных флуорофорами, образующими FRET-пару (вы можете заказать [синтез зондов в Lumiprobe](#)). Помимо ДНК-зондов, для детекции флуоресценции может использоваться интеркалирующий краситель [dsGreen](#).

Одна пробирка лиофилизованной смеси после разведения в 450 мкл воды рассчитана на проведение 100 реакций объемом 25 мкл.

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).
- Протекторы для лиофилизации.

Возможные приложения

Качественная и количественная ПЦР с детекцией продуктов амплификации как в режиме реального времени, так и с помощью гель-электрофореза, ПЦР после обратной транскрипции.

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

Совместимость с оборудованием

Совместима 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 при комнатной температуре, 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.

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

• **Расчет на 1 реакцию ПЦР объемом 25 мкл* с детекцией в режиме реального времени:**

Компонент	Объем	Примечание
5x Реакционная смесь PCR/qPCR с UDG	5 мкл	
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)
Деионизированная вода	Согласно рекомендации производителя	
	Добавляется до общего объема реакции 25 мкл*	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 30–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.4)
Общий объём реакции	25 мкл*	При использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

• **Расчет на 1 реакцию ПЦР объемом 25 мкл* с детекцией методом гель-электрофореза:**

Компонент	Объем	Примечание
5x Реакционная смесь PCR/qPCR с UDG	5 мкл	
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	
Деионизованная вода	Добавляется до общего объема реакции 25 мкл*	
ДНК	2–9 мкл (кДНК, 30–100 нг геномной ДНК, 1–100 пг плазмидной ДНК)	Добавляется отдельно в каждую пробирку (см. п.4)
Общий объём 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 проведение реакции в объеме меньше 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, закройте крышки пробирок, стрипов или заклейте планшет плёнкой, 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 (на этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	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 (на этом этапе должна производиться детекция флуоресценции)	55–59°C	10–15 с	
Элонгация	72°C	15–30 с	

- В случае использования интеркалирующего красителя, после проведения амплификации, для того чтобы убедиться в отсутствии неспецифической амплификации, рекомендуется провести плавление ампликона в диапазоне от 60 до 95°C.
- 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 храните 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.

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