

Реакционная смесь для ПЦР/кПЦР ProbeMaster® UDG, 5x

Смесь PCR/qPCR с UDG подходит как для проведения количественной ПЦР, так и для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза. Готовая 5-кратная реакционная смесь содержит необходимые компоненты для проведения ПЦР, ее состав оптимизирован для получения идеальных результатов по процессивности и специфичности амплификации (содержит Hot-start полимеразу), а урацил-ДНК-гликозилаза исключает контаминацию ампликонами от предыдущих реакций и получение ложноположительных результатов. В случае постановки реакции кПЦР, 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](#) (dsGreen). Объем смеси 1 мл рассчитан на проведение 200 реакций объемом 25 мкл.

Состав реакционной смеси: HS Taq ДНК-полимеразы, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (включая dUTP), урацил-ДНК-гликозилаза (UDG), ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+} с концентрацией 3 мМ в 1х реакционной смеси).

Совместимость с оборудованием: совместим с амплификаторами любого типа.

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.

Протокол

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 2 и более повторах для каждого образца ДНК.

! Объем реакции может варьироваться в зависимости от конкретной задачи, однако объем реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

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) |
| | Согласно рекомендации производителя | |
| 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.3) |
| Общий объем 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.3) |
| Общий объем реакции | 25 мкл* | |

* при использовании другого объема реакции следует пересчитать объемы компонентов реакции с сохранением приведенных пропорций

1. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, закройте крышки пробирок, стрипов или заклейте планшет пленкой, сбросьте капли центрифугированием.

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 $T_a = T_m - 5$ °C.

○ **Если температура отжига праймеров ≥ 60 °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) | 60–72 °C | 30–60 сек | |

○ **Если температура отжига праймеров < 60 °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) | 55–59 °C | 10–15 сек | |
| Элонгация | 72 °C | 15–30 сек | |

! 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.

1. 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 хранить продукты амплификации при -20 °C.

Хранение: -20 °C.

Число циклов замораживания/размораживания: не более 20.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.