

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

ProbeMaster® GEL — готовая 5-кратная реакционная смесь, содержащая все необходимые компоненты для проведения ПЦР. 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 также позволяет четко контролировать время электрофореза.

Реакционная смесь ProbeMaster® GEL подходит для амплификации ДНК с последующей детекцией результатов методом электрофореза, и может быть использована для рутинных задач по клонированию и других задач, требующих дальнейшего использования продукта ПЦР после амплификации (смесь не содержит UDG/dUTP).

Из-за содержания красителей видимого спектра, ProbeMaster® GEL не подходит для ПЦР в режиме реального времени. При необходимости Вы можете заказать реакционную смесь для ПЦР в реальном времени [ProbeMaster® UNI](#).

Состав реакционной смеси

- HS Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер (содержит Mg^{2+});
- краситель для нанесения на гель.

Ключевые характеристики

- 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. Формат готовой реакционной смеси снижает риск контаминации образцов.
- 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.
- Содержит высокопроцессивную Hot-Start Taq-полимераза с активацией 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.
- HS Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной активностью; также обладает трансферазной активностью: присоединяет дополнительный адениновый остаток к 3' концам двуцепочечной ДНК, что позволяет использовать продукты ПЦР для ТА-клонирования.

- 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

Стандартная ПЦР, ОТ-ПЦР, генотипирование, ПЦР для проверки колоний, получение продукта для ТА-клонирования и др.

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)
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 работать с объемом реакции менее 10 мкл не рекомендуется.

3. В пробирки для ПЦР внесите готовую смесь без учета объема образца ДНК. Образцы ДНК внесите отдельно в каждую пробирку, сбросьте капли центрифугированием.
4. 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 $< 60^{\circ}\text{C}$**

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

5. 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](#).

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

Условия хранения

- Транспортировка/Хранение: при температуре не выше -20°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.