

5X ScreenMix-HS (UDG)

Версия 2 от 22 июля 2022 г.

Окрашенная реакционная смесь 5X ScreenMix-HS (UDG) предназначена для проведения ПЦР с последующим электрофоретическим анализом продукта в агарозном геле. В состав смеси входят UDG (урацил-ДНК-гликозилаза) и нуклеотиды dUTP. На первом этапе фермент UDG разрушает все ранее амплифицированные ПЦР-продукты по включенным остаткам dUTP, что предотвращает кросс-контаминацию.

В состав 5X ScreenMix-HS (UDG) входят все необходимые компоненты ПЦР: Taq ДНК-полимераза с «горячим стартом», UDG, смесь dNTP (включая dUTP в оптимальной пропорции), ионы Mg^{2+} , ПЦР буфер, глицерин, красители (красный и желтый).

Красители и глицерин позволяют после прохождения ПЦР напрямую наносить реакционную смесь на гель для проведения электрофореза.

Для постановки реакции ПЦР в смесь требуется добавить только праймеры, ДНК-матрицу и воду.

Продукт	Кат. #	Объем смеси	Кол-во реакций по 25 мкл
5X ScreenMix-HS (UDG)	PK243S	0.5 мл	100
	PK243L	5 мл (10 x 0.5 мл)	1 000

Хранение и транспортировка: при $-20^{\circ}C$.

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

Использование: не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Перед использованием разморозить при комнатной температуре и хорошо перемешать перемешиванием пробирки без образования пены.

Свойства полимеразы

- 5' → 3' полимеразная активность.
- 5' → 3' экзонуклеазная активность.
- 3'-dA аденилтрансферазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации ($95^{\circ}C$, 5–10 с).

Свойства урацил-ДНК-гликозилазы

- Температурный оптимум работы фермента: $37^{\circ}C$.
- Инактивация при прогревании в течении 10 минут при $95^{\circ}C$.
- Деградация не менее 200 нг матриц, содержащих урацил.

Свойства реакционной смеси

- В 1X реакционной смеси концентрация магния 3 мМ, концентрация dATP, dGTP и dCTP — 0.12 мМ, dTTP/dUTP — 0.06 мМ.
- Смесь оптимизирована для специфичной работы Taq ДНК-полимеразы и UDG, длительного хранения, многократного замораживания-размораживания.
- Смесь содержит красный и желтый красители, не влияющие на работу полимеразы и урацил-ДНК-гликозилазы, а также компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель.

В 1% агарозном геле с 1X TAE буфером электрофоретическая подвижность красного красителя соответствует фрагменту ДНК размером 1 000 п.н., желтый краситель мигрирует с фронтом на уровне фрагментов 20–30 п.н.

Преимущества использования

- Предотвращается контаминация ранее амплифицированными ПЦР-продуктами, содержащими урацил.
- Сокращается время на подготовку реакции.
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).
- Автоматический «горячий старт» повышает специфичность реакции.
- Облегчается стадия нанесения на гель. Благодаря высокой плотности смеси — не требуется добавления в пробу буфера для нанесения.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в T-вектор (например, pAL2-T вектор, кат.# TA002) за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков.

Ограничения к использованию

- Если планируется очистка ПЦР-продукта из реакционной смеси, рекомендуем проводить ее сразу после амплификации или заморозить продукт сразу после прохождения ПЦР до начала очистки. Это необходимо, чтобы избежать деградации ПЦР-продукта из-за остаточной активности UDG.
- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 3 т.п.о. Для амплификации длинных фрагментов ДНК можно использовать набор Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101).
- Не рекомендуется использовать для амплификации сложных смесей ДНК и для высокоточной амплификации фрагментов ДНК. Для решения таких задач лучше использовать набор Encyclo Plus PCR kit (кат. # PK101) или Tersus Plus PCR kit (кат. # PK121).
- Из-за содержания красителя смесь 5X ScreenMix-HS не может использоваться для ПЦР в реальном времени и других приложений, требующих измерения оптического поглощения или флуоресценции пробы. Для таких приложений следует использовать смеси серии 5X qPCRmix-HS или 5X qPCRmix-HS SYBR.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте реакционную смесь и тщательно перемешайте.
2. Смешайте компоненты реакции в следующей последовательности:

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	—
5X ScreenMix-HS (UDG)	5 мкл	1X
ПЦР праймер 1	переменное	0.2–0.4 мкМ
ПЦР праймер 2	переменное	0.2–0.4 мкМ
ДНК-матрица	переменное	1–100 нг на реакцию

Примечание: в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю минерального масла.

3. Режим амплификации

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Обработка UDG	1	37 °С	10 мин
Инактивация UDG Активация полимеразы	1	95 °С	10 мин
Денатурация		94–95 °С	15–30 с
Отжиг	до 40	T _m (50–68 °С)	15–30 с
Элонгация		68–72 °С	30–60 с на 1 т.п.о.





T_m — оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьирует от 50 до 68 °С. Для приблизительного расчета температуры отжига (T_m) можно воспользоваться формулой:





$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

4. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Анализ рекомендуется проводить непосредственно после завершения амплификации во избежание деградации ПЦР-продукта из-за остаточной активности UDG, либо до проведения гель-электрофореза ПЦР-продукт следует заморозить на –20 °С. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения.

Примечание: Для анализа ПЦР-продуктов и их очистки рекомендуется использовать агарозные гели на 1X TAE буфере (кат. ## PB022, PB122) с бромистым этидием.









Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу НАБОРА





Выделение и очистка нуклеиновых кислот    









Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ    




Синтез и амплификация кДНК       

Клонирование ДНК        

Выявление контаминации микоплазмой    





Оценка ДНК    

Нормализация кДНК        

Практикум по геной инженерии    

Генотипирование    

Синтез олигонуклеотидов и зондов    

Секвенирование по Сэнгеру    

NGS секвенирование    

Синтез генов    

Сайт-направленный мутагенез    

Синтез органических соединений    

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru