

ScreenMix-HS (UDG)

5X окрашенная реакционная смесь ScreenMix-HS (UDG) предназначена для проведения ПЦП 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 ПЦП-продукты по включенным остаткам dUTP, что предотвращает кросс-контаминацию.

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

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

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

Продукт	Кат. #	Объем смеси	Кол-во реакций по 25 мкл
ScreenMix-HS (UDG)	PK243S	0.5 мл	100
	PK243L	5 мл (10 x 0.5 мл)	1000

Хранение и транспортировка: при -20 °С.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год с момента поставки.

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°C, 5-10 с)

Свойства урацил-ДНК-гликозилазы

- Температурный оптимум работы фермента: 37°C
- Инактивация при прогревании в течении 10 минут при 95°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 1000 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 Т-вектор (например, pAL2-Т вектор, кат.#ТА002) 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 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 qPCRmix-HS или 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
Стерильная вода	до 25 мкл	-
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°C	10 мин
Инактивация UDG Активация полимеразы	1	95°C	10 мин
Денатурация		94-95°C	15 - 30 с
Отжиг	до 40	T _m (50-68°C)	15 - 30 с
Элонгация		68 - 72°C	30 - 60 с на 1 т.п.о.

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

$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

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°C. 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.

Продукты и услуги компании Евроген

Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот **P** >>>

Маркеры длин ДНК **P** >>>

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P** >>>

Приготовление библиотек кДНК **P** >>> **S** >>>

Синтез кДНК и RACE **P** >>> **S** >>>

Клонирование ДНК **P** >>> **S** >>>

Нормализация кДНК **P** >>> **S** >>>

Практикум по геной инженерии **P** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **S** >>>

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S** >>>

Синтез генов **S** >>>

Сайт-направленный мутагенез **S** >>>

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

P >>> – ссылка на страницу ПРОДУКТА

S >>> – ссылка на страницу УСЛУГИ

Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P** >>>

Флуоресцентные белки **P** >>>

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P** >>>

Антитела против флуоресцентных белков **P** >>>

Временная трансфекция клеточных линий **S** >>>

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S** >>>

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S** >>>

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии и генетики наследственных заболеваний **S** >>>

Техническая поддержка: oncology@evrogen.ru

Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, корп. 15

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru

order@evrogen.ru