

## qPCRMix-HS (UDG)

5X реакционная смесь qPCRMix-HS (UDG) предназначена для ПЦР и ПЦР-РВ с защитой от контаминации полученными ранее ПЦР-продуктами. ПЦР в реальном времени возможна как с флуоресцентными зондами (TaqMan пробы), так и с интеркалирующими красителями (SYBR Green, Eva Green). 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. Это помогает предотвратить кросс-контаминацию, не влияя на эффективность ПЦР и последующие анализы (например, анализ кривой плавления или гель-электрофорез ПЦР-продукта).

qPCRMix-HS (UDG) содержит все необходимые компоненты ПЦР: Taq ДНК-полимеразу с «горячим стартом», UDG, смесь dNTP (включая dUTP в оптимальной пропорции), ионы  $Mg^{2+}$ , ПЦР буфер.

Для выполнения ПЦР в смесь требуется добавить праймеры, ДНК-матрицу и воду. При использовании для ПЦР в реальном времени в смесь добавляются компоненты для детекции ДНК в зависимости от применяемого метода.

Продукт	Кат. #	Объем смеси	Кол-во реакций по 25 мкл
qPCRMix-HS (UDG)	PK245S	0.5 мл	100
	PK245L	5 мл (10 x 0.5 мл)	1000

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

**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 переворачиванием 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, dCTP — 0.12 мМ, dTTP/dUTP — 0.06 мМ;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы Taq ДНК-полимеразы и UDG, длительного хранения, многократного замораживания-размораживания.

### **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;
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в Т-вектор (например, pAL2-Т 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).

## 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	-
qPCRMix-HS (UDG)	5 мкл	1X
ПЦР праймер 1	переменное	0.2 - 0.4 мкМ
ПЦР праймер 2	переменное	0.2 - 0.4 мкМ
Интеркалирующий краситель или флуоресцентный зонд	переменное	в зависимости от применяемой методики
ДНК-матрица	переменное	1-100 нг на реакцию

### 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	10 - 30 с
Отжиг	до 50	T <sub>m</sub> (50-68°C)	10 - 30 с
Элонгация		68 - 72°C	30 - 60 с на 1 т.п.о.

T<sub>m</sub> — оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьирует от 50 до 68°C. Для приблизительного расчета температуры отжига (T<sub>m</sub>) можно воспользоваться формулой:

T<sub>m</sub> (°C) = 2 x (A+T) + 4 x (G+C).

4. Полученные ПЦР-продукты продукты амплификации рекомендуется заморозить на -20°C до проведения дальнейших анализов (например, методом электрофореза) во избежание их деградации из-за остаточной активности UDG.

**Примечание:** Для анализа ПЦР-продуктов и их очистки рекомендуется использовать агарозные гели на 1X TAE буфере (кат. ## PBO22, 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](mailto: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](mailto:customer-support@evrogen.ru)*

### Молекулярно-генетические исследования

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

*Техническая поддержка: [oncology@evrogen.ru](mailto: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](http://www.evrogen.ru)

[order@evrogen.ru](mailto:order@evrogen.ru)