

5X qPCRmix-HS (UDG)

Версия 2 от 19 апреля 2022 г.

Реакционная смесь 5X qPCRmix-HS (UDG) предназначена для ПЦР и ПЦР-РВ с защитой от контаминации полученными ранее ПЦР-продуктами. ПЦР в реальном времени возможна с интеркалирующими красителями (SYBR Green, EVA Green) и флуоресцентными зондами (TaqMan пробы), в том числе с целью генотипирования. 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).

5X 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
5X qPCRmix-HS (UDG)	PK245S	0.5 мл	100
	PK245L	5 мл (10 x 0.5 мл)	1000

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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 °С, 5–10 с).

Свойства урацил-ДНК-гликозилазы

- Температурный оптимум работы фермента: 37 °С.
- Инактивация при прогревании в течении 10 минут при 95 °С.
- 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, рAL2-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 дегградации ПЦР-продукта из-за остаточной активности UDG.
- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной выше 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
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	–
5X 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 °С	10 мин
Инактивация UDG Активация полимеразы	1	95 °С	10 мин
Денатурация		94–95 °С	10–30 с
Отжиг	до 50	T _m (50–68 °С)	10–30 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. Полученные ПЦР-продукты продукты амплификации рекомендуется заморозить на –20 °С 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. ## 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