



Общество с ограниченной ответственностью

«Биолабмикс»

ИНН 5408278957 КПП 540801001

630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,

ул. Инженерная, дом № 28

Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40

E-mail: sales@biolabmix.ru

## **БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×)**

Кат. номер MHR030-400, MHR030-2040

### **Описание:**

Набор БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) содержит 2× реакционную смесь БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×), 50 мМ раствор MgCl<sub>2</sub> и стерильную воду. 2× реакционная смесь БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) предназначена для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I на амплификаторах, поддерживающих нормализацию данных по флуоресцентному красителю ROX. В состав БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- Высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg<sup>2+</sup> (3 мМ);
- SYBR Green I;
- Флуоресцентный краситель ROX;
- Инертный краситель.

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с "горячим" стартом в режиме реального времени с образцами геномной, плазмидной и вирусной ДНК. БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) реакционная смесь содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы, что позволяет повысить специфичность ПЦР и использовать матрицы со сложной пространственной структурой.

ДНК-полимераза, входящая в состав БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×), неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин.

Инертный краситель в составе БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) окрашивает её в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования. Низкое содержание магния в реакционной смеси и пробирка со 50 мМ раствором MgCl<sub>2</sub> позволяют оптимизировать условия реакции под конкретную систему (праймеры/ матрица).

Смесь идеально подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX: Life Technologies (ABI) 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne Plus.

### Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2*)	50 mM MgCl <sub>2</sub>	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MHR030-400	4 × 1,25 мл	1 × 1 мл	4 × 1,25 мл	400
MHR030-2040	17 × 1,5 мл	1 × 1,8 мл	2 × 1,8 мл	2040

### Состав БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2\*)

100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,4 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,12 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, SYBR Green I, 0,9 мкМ флуоресцентный краситель ROX и инертный краситель.

### Область применения

- ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I;
- Обычная ПЦР;
- Высоковоспроизводимая ПЦР;
- Генотипирование.

### Свойства полимеразы

Рекомбинантная Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной HS-Taq ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*. Скорость продвижения Taq ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 2 т. п.о./мин. Рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени.

### SYBR Green I

SYBR Green I - флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени. SYBR Green I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов. В ходе амплификации краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР-продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал. Максимумы поглощения и испускания SYBR Green I 494 нм и 521 нм соответственно, что позволяет использовать его со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени.

## **Пассивный флуоресцентный краситель ROX**

В состав смеси входит пассивный флуоресцентный краситель ROX, служащий внутренним стандартом для нормализации сигнала красителей, входящих в состав олигонуклеотидных зондов, при работе на ПЦР платформах, поддерживающих такую возможность (Applied Biosystems). ROX позволяет корректировать вариации между пробирками (лунками), возникающие из-за ошибок пипетирования, флуктуации флуоресценции. Присутствие ROX не оказывает влияния на протекание ПЦР и измерение уровня флуоресцентного сигнала, если смесь используется с другими ПЦР-платформами. Необходимо, однако, учитывать, что включение ROX в смесь ограничивает использование этого флуорофора для олигонуклеотидных зондов, а также других красителей, имеющих схожие спектральные характеристики ( $E_m \sim 621 \text{ нм}$ ).

## **Инертный краситель**

Инертный краситель в составе БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубой краски соответствует 615 нм.

## **Свойства реакционной смеси**

- Реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии “горячий старт” и активируется после инкубации при 95 °C в течение 5 мин;
- Позволяет проводить нормировку по флуоресцентному красителю ROX;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) в течение месяца при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания.

## **Преимущества использования**

- Фермент с “горячим стартом” повышает специфичность, чувствительность и выход реакции;
- Для активации HS-Taq ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин.;
- Смесь окрашена для облегчения раскапывания;
- Сокращается время на подготовку реакции;
- Снижается вероятность контаминации и ошибки при смешивании компонентов ПЦР;
- Возможность нормировки данных;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).

## Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-мечеными зондами. Для таких приложений следует использовать наборы БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x) или БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX (2x).

## Протокол проведения амплификации

1. Разморозить реакцию смесь и тщательно перемешать.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x)	12,5	1x
Прямой праймер	переменный	0,1-600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-600 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг-1 мкг
Стерильная вода	до 25 мкл	

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.
4. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	
Отжиг	50-68	5-15 сек	30-50
Элонгация	58-72	10-30 сек	
Кривая температур плавления	65-95		1

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

**Примечание.** Мониторинг ПЦР в реальном времени можно проводить при 72 °C, в случае отсутствия неспецифических продуктов (праймер-димеров). Если образуются неспецифические продукты с Tm1 ниже, чем Tm2 целевого продукта, то мониторинг реакции проводят при температуре между Tm1 и Tm2.

## Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:  
при +25 °C – 7 дней; при +4 °C – 4 месяца; при -20 °C – 18 месяцев;  
не более 50 циклов замораживания-размораживания.

## Условия транспортировки

Транспортируется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.