



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 UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)

Кат. номер MHR023-400, MHR023-2040

Описание

Набор БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) содержит 2x реакционную смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) и стерильную воду. 2x реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) предназначена для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов на амплификаторах, поддерживающих нормализацию данных по флуоресцентному красителю ROX. В состав БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу, праймеры и зонд):

- высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- N-урацил-ДНК-гликозилаза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg²⁺;
- краситель ROX.

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с "горячим стартом" в режиме реального времени с образцами геномной, плазмидной и вирусной ДНК. В состав смеси входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность HS-Taq ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности в ходе ПЦР. Реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) не содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

N-урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ) и дУТФ (в пропорции с дТТФ) обеспечивают надежную защиту от переноса ампликона между реакционными смесями (кросс-контаминации). ДНК-полимераза, входящая в состав БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x), неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин.

БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) идеально подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX: Life Technologies (ABI) 7500, 7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio 12K; Stratagene Mx4000, Mx3005P, Mx3000P. Представленная форма набора для

проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MHR023-400	4 × 1,25 мл	4 × 1.25 мл	400
MHR023-2040	17 × 1,5 мл	3 × 1,8 мл	2040

Состав БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)

100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, смесь нуклеозидтрифосфатов (включая дУТФ), 10 mM MgCl₂, 0,1 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, N-урацил-ДНК-гликозилаза, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы, 60 нМ флуоресцентный краситель ROX.

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями.

Для таких приложений следует использовать наборы БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x) или БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x).

Область применения:

- ПЦР с "горячим стартом" в режиме реального времени с применением флуоресцентно-меченых зондов и нормировкой данных по сигналу ROX;
- Обычная ПЦР;
- Высоковоспроизводящая ПЦР;
- Мультиплексная ПЦР;
- Генотипирование.

Свойства полимеразы

Рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной Taq ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*. Скорость продвижения Taq ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 1 т.п.о./мин. Рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР и 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 ($E_{m} \sim 621 \text{ нм}$).

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;
- Предотвращает повторную амплификацию ПЦР-продуктов, попавших в реакционную смесь из другой смеси;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение BioMaster UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x) в течении 7 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания.

Преимущества использования

- Фермент с “горячим стартом” повышает специфичность, реакции;
- Для активации HS-Taq ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин;
- Высокие селективность и выход реакции;
- Сокращается время на подготовку реакции;
- Защита от кросс-контаминации;
- Возможность нормировки данных;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах);
- Минимизируются трудозатраты.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозить реакционную 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 UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)	12,5	1x
Прямой праймер	переменный	0,1-600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-600 нМ
Зонд	переменный	0,1-300 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, °С	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	
Отжиг	50-68	5-15 сек	30-50
Элонгация	58-72	5-30 сек	

Либо:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	
Отжиг/ элонгация	50-68	5-15 сек	30-50

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °С - 7 дней; при +4 °С - 4 месяца; при -20 °С - 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.