



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 Hi-ROX SYBR (2x)

Кат. номер MHR032-400, MHR032-2040

Описание:

Набор БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) содержит 2x реакционную смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x), 50 мМ раствор MgCl₂ и стерильную воду. 2x реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) 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 UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- Высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- N-урацил-ДНК-гликозилаза;
- Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg²⁺ (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 UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) 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.

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 Hi-ROX SYBR (2x), неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин.

Инертный краситель в составе БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) окрашивает её в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

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 UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2*)	50 мМ MgCl ₂	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MHR032-400	4 × 1.25 мл	1 × 1 мл	4 × 1.25 мл	400
MHR032-2040	17 × 1.5 мл	1 × 1,8 мл	2 × 1,8 мл	2040

Состав БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2*):

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 100 мМ КСl, смесь нуклеозидтрифосфатов (включая дУТФ), 3 мМ MgCl₂, 0.12 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, N-урацил-ДНК-гликозилаза, 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 UDG 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; Присутствие дУТФ гарантирует встраивание уридина в каждую синтезированную цепь ДНК, УДГ способна удалять урацил из одно- и двух-цепочечных молекул ДНК;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) в течении 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;
- Предотвращает повторную амплификацию ПЦР-продуктов, попавших в реакционную смесь из другой смеси;
- 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 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 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 перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.
4. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	
Отжиг	50-68	10-30 сек	30-50
Элонгация	58-72	10-30 сек	
Кривая температур плавления (рекомендуема)	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:

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

Условия транспортировки:

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