



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

ФармМастер HS-qPCR

Кат. номер FMH020-400; FMH020-2040

Описание

Реагент ФармМастер HS-qPCR (2×) разработан для проведения сублимационной сушки (лиофилизации) без дополнительной модификации и предназначен для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. В реакционную смесь перед лиофилизацией могут быть добавлены праймеры и зонды для снижения количества шагов пробоподготовки при проведении ПЦР.

Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения и изменить их условия. Хранение ФармМастер HS-qPCR (2×) после лиофилизации в течение трех месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°C не снижает эффективность ПЦР.

В состав ФармМастер HS-qPCR (2×) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу, праймеры и зонд):

- высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} ;
- криопротекторы;
- стабилизаторы.

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 во время ПЦР. Реакционная смесь ФармМастер HS-qPCR не содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

ДНК-полимераза, входящая в состав смеси, неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °C в течение 5 мин. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер HS-qPCR (2х)	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
FMH020-400	4 × 1,25 мл	4 × 1,25 мл	400
FMH020-2040	17 × 1,5 мл	3 × 1,8 мл	2040

Состав ФармМастер HS-qPCR (2х):

100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,6 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 10 mM MgCl₂, 0,15 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,2% Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы, криопротекторы.

Область применения

- Разработка лиофилизированных наборов для ПЦР-диагностики
- ПЦР с "горячим стартом" в режиме реального времени с применением флуоресцентно-меченых зондов;
- Обычная ПЦР;
- Высоковоспроизводимая 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.

Свойства реакционной смеси

- Может быть лиофилизированна;
- Реакционная смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Не теряет активности при разморозке/заморозке до 30 раз;
- Смесь не содержит красители, что делает её универсальной.

Преимущества использования

- Фермент с "горячим стартом" повышает специфичность, чувствительность и выход реакции;
- Для активации HS-Taq ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин;
- Высокие селективность и выход реакции;
- Сокращается время на подготовку реакции;
- Снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов ПЦР;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).

Протокол проведения сублимационной сушки (лиофилизации)

Для лиофилизации ФармМастер HSqPCR (2×) рекомендуется использовать лиофильные сушилки (сублиматоры) с греющимися полками. Лيوфилизацию можно проводить как исходной 2× смеси (по 12,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), так и разведенной до 25% (по 15,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), например, после добавления праймеров.

Рекомендуемая программа сублимационной сушки

Шаг программы	Температура полки, °C	Время инкубации, мин	Давление в камере, Па
1	-40	180	100000
2	-40	120	10-15
3	-20	120	10-15
4	-10	120	10-15
5	0	90	10-15
6	10	120	10-15
7	20	180	10-15

После лиофилизации **смесь** может быть легко восстановлена добавлением воды без нуклеаз. При ресуспендировании можно менять кратность получаемой смеси объемом добавляемой воды.

Лيوфилизированную реакционную смесь рекомендовано хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25 °C – до 3 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C – 24 месяца. Условия хранения лиофилизированной реакционной смеси с добавлением праймеров и зондов могут отличаться и требуют подтверждения.

Протокол выполнения амплификации

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте <http://biolabmix.ru/catalog>

Для проведения реакции ПЦР-ПВ с использованием 2× реакционной смеси **ФармМастер HSqPCR (2×)** рекомендуем использовать следующий протокол:

1. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
ФармМастер HSqPCR (2×)	12,5	1×
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	

2. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

3. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

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

Либо:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	30-50
Отжиг/ элонгация	50-68	30-60сек	

4. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25 °C – до 15 дней; при +4 °C – 2 месяца; при -20 °C – 1,5 года; не более 30 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.