



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

LyоМастер HS-qPCR

Кат. номер LMН020-200, LMН020-1000

Описание

Набор LyоМастер HS-qPCR содержит лиофилизированную смесь LyоМастер HS-qPCR и стерильную воду. Лيوфилизированная LyоМастер HS-qPCR предназначена для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. Лيوфилизированная форма удобна в обращении, не требует специального температурного режима для транспортировки и хранения реактива. Для подготовки реагента к использованию достаточно добавить безнуклеазную воду.

В состав LyоМастер HS-qPCR 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 LyоМастер 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	LyоМастер HS-qPCR	Кол-во реакций по 20 мкл
LMН020-200	4 × 0,5 мл	200
LMН020-1000	20 × 0,5 мл	1000

Состав LyoMaster HS-qPCR при разведении в 0,5 мл воды

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

- 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

- Реакционная смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Реакционная смесь представлена в лиофилизированной форме и не требует особых температурных условий хранения;
- Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения. Хранение LyoMaster HS-qPCR в течение шести месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°C не снижает эффективность ПЦР;
- После ресуспендирования смесь не снижает эффективности после 30 циклов заморозки/разморозки;
- Ресуспендированная реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии "горячий старт" и активируется после инкубации при 95 °C в течение 5 мин.

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).

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями. Для таких приложений следует использовать набор LyoMaster HS-qPCR SYBR Blue (2×). Для амплификаторов, использующих нормировку по ROX, используйте соответствующие модификации смеси (смотрите сайт <https://biolabmix.ru/catalog/pcr/probes/>).

Протокол выполнения амплификации

Лиофилизированная форма реакционной смеси позволяет более гибко подходить к схеме её использования. Ниже представлено три варианта протоколов использования лиофилизированной смеси **LyoMaster HS-qPCR: базовый, модифицированный и кастомизированный.**

Базовый протокол

Базовый протокол предполагает получение 2× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 500 мкл стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Модифицированный протокол

Модифицированный протокол предполагает получение 4× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 250 мкл стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Кастомизированный протокол

Кастомизированный протокол – это протокол, разработанный пользователем. Данный подход может быть удобен при использовании всего объема пробирки, например, для тестирования с одной парой праймеров или при ином варианте. Пользователь самостоятельно может определять объем и состав растворителя. В случае кастомизированного подхода объем реакции можно варьировать, а кратность смеси зависит от выбранного объема растворителя.

Состав реакционной смеси для проведения амплификации.

1. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 20 мкл (для базового и модифицированного протоколов):

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация
LyoMaster HS-qPCR (2×)/(4×)	10/5	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 20 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	3-5 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	3-5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	30-50
Отжиг/ элонгация	50-68	30-60сек	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °C – до 6 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C – 18 месяцев.

Условия транспортировки

Транспортировка при температуре окружающей среды до 14 суток, при этом, температура не должна превышать +30°C. **Берегите от влаги!**