

Информация о продукте

БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)

Описание продукта

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

- Высокопроцессивная рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза;
- 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 HS-qPCR Lo-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.

ДНК-полимераза, входящая в состав **БиоМастер HS-qPCR Lo-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 HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)** 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 MgCl₂ 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) 7500, 7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio 12K; Stratagene Mx4000, Mx3005P, Mx3000P.

Состав набора

Кат. #	БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)	50 мМ MgCl ₂	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MHR031-400	4 × 1.25 мл	1 × 1 мл	4 × 1.25 мл	400
MHR031-2040	17 × 1.5 мл	1 × 1,8 мл	2 × 1.8 мл	2040

"горячий" старт и активируется после инкубации при 95 °С в течение 5 мин;

Состав БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x):

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 100 мМ КСl, 0.4 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 3 мМ MgCl₂, 0.12 ед. акт./мкл *HS-Taq* ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы *HS-Taq* ДНК-полимеразы, SYBR Green I, 60 нМ 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 1 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 (Em ~ 621нм).

Инертный краситель

Инертный краситель в составе **БиоМастер HS-qPCR Lo-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
4. Проведите ПЦР используя рекомендованные ниже температурные условия:

- Позволяет проводить нормировку по флуоресцентному красителю ROX;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы *HS-Taq* ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение **БиоМастер HS-qPCR Lo-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 Lo-ROX (2x)** или **БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)**.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте реакционную смесь и тщательно перемешайте.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер HS-qPCR Lo-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. Проведите ПЦР используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5-7 мин	1
Денатурация	95	15 сек	30 - 50
Отжиг	50 - 68	10-30 сек	
Элонгация	58 - 72	30-60 сек	
Кривая температур плавления (рекомендуема)	65 - 95		1

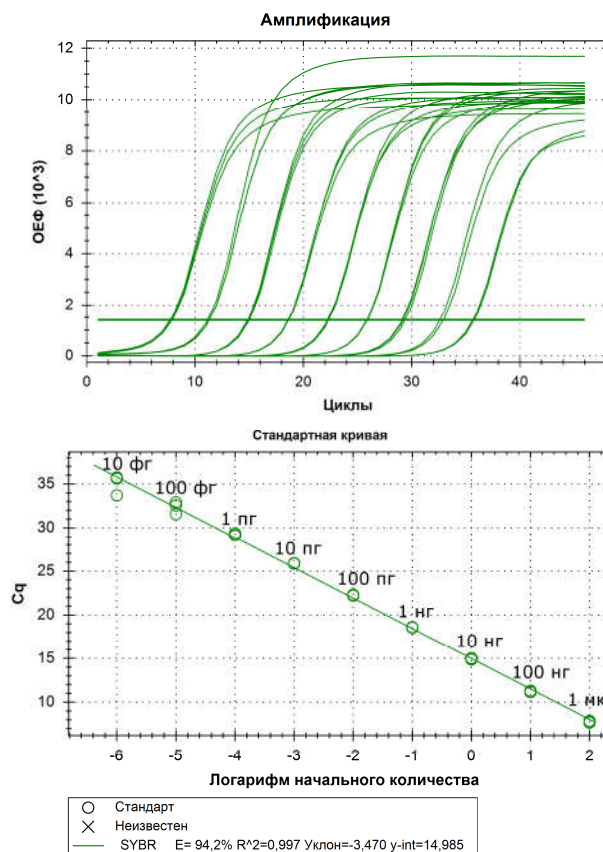
5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

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.

Хранение: в месте, защищенном от попадания света: при +4 °C – 3 месяцев; при -20 °C – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Транспортировка: при 0 - +4 °C.

Кривые амплификации и стандартная кривая, полученные при проведении ПЦР в реальном времени с использованием БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)



Амплификация фрагмента кДНК гена 18S мРНК в серии 10 кратных разведений от 10 фг до 1 мкг. Длина ампликона – 120 п.н. Реакция проводилась на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad). Кривые амплификации и стандартная кривая показывают область линейности системы.

Рекомендации для предупреждения контаминаций при ПЦР.

Во время ПЦР нарабатывается более 10 миллионов копий ДНК-матрицы. Таким образом, необходимо следить за возможностью попадания других матриц и ампликонов которые могут присутствовать в лаборатории. Ниже представлены общие рекомендации для снижения риска контаминации:

- Процедуры по подготовке ДНК образцы, замешиванию ПЦР смеси, амплификацию и анализ ПЦР продуктов необходимо проводить в разных территориальных зонах.
- Подготавливайте ПЦР смеси в ПЦР-шкафах с ламинарным потоком и оснащенных УФ-лампой.
- Используйте новые перчатки для очистки ДНК и приготовления ПЦР смесей.
- Используйте реагенты предназначенные для ПЦР. Используйте наконечники для пипеток снабженные аэрозольным фильтром для подготовки ДНК образцов и замешивания смесей ПЦР.
- Всегда готовьте смесь без ДНК матрицы (отрицательный контроль) для проверки на контаминацию.

Рекомендации для подбора праймеров

Для подбора праймеров используйте хорошо зарекомендовавшие себя программы типа Primer3 http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi или Oligo <http://www.oligo.net/> и следуйте основным правилам при подборе праймеров для ПЦР:

- Длина праймера, в основном, составляет 18 – 30 нуклеотидов;
- Температура плавления 58-65 °С. Разница в температурах плавления (Tm) двух праймеров не должна превышать 3 °С;
- Рекомендуемая длина ампликона в ПЦР в режиме реального времени 50 – 200 п.н.;
- Оптимальный GC состав праймеров 40 - 60%. В идеале, G и C нуклеотиды должны быть распределены равномерно по всей длине праймера.
- Избегайте формирования на 3'-конце праймера формирования подряд более трех G или C нуклеотидов для снижения риска неспецифического отжига.
- Если возможно, праймер должен заканчиваться на 3' конце G или C нуклеотидом.
- Избегайте праймеров с самокомплементарными участками, комплементарности между праймерами и направленных праймер-повторов для предотвращения формирования шпилек и димеров праймеров.
- Проверьте возможность присутствия нежелательных сайтов комплементарности между праймерами и ДНК-матрицей.
- Проверяйте свои праймеры при помощи BLAST.

Компоненты реакционной смеси

ДНК-матрица

Оптимальное количество ДНК-матрицы для реакционной смеси объемом 50 мкл составляет 0.01 – 1 нг в случае плазмиды и фаговой ДНК и 0.1 – 1 мкг в случае геномной ДНК. Более высокие количества матрицы повышают риск образования неспецифических продуктов амплификации, низкие количества матрицы снижают точность амплификации. Все общепринятые методы очистки ДНК могут применяться для подготовки анализируемого образца. Стоит помнить, что следовые количества определенных агентов, используемых для выделения и очистки ДНК, таких как фенол, ЭДТА и

протеиназа К могут ингибировать ДНК полимеразу. Осаждение и неоднократная промывка 70% этанолом обычно приводит к удалению следовых загрязнений из образца ДНК.

Праймеры

Рекомендуемые концентрации праймеров для ПЦР находятся в диапазоне 0.1 – 0,6 мМ. Завышенные концентрации праймеров повышают вероятность неспецифического связывания с матрицей и образования альтернативных ПЦР-продуктов.

Для праймеров вырожденных и используемых в ПЦР длинных фрагментов рекомендуются более высокие концентрации в диапазоне 0.3 – 1 мкМ.

Концентрация ионов Mg²⁺

Изменение концентрации ионов Mg²⁺ может оказывать заметное влияние на эффективность и специфичность ПЦР. Эти ионы необходимы для проявления Taq ДНК-полимеразой полимеразной активности. А также связываются с дезоксирибонуклеотидами в соотношении 2:1. В следствии этого может потребоваться дополнительная оптимизация концентрации ионов Mg²⁺ при изменении концентрации дезоксирибонуклеотидов в реакционной смеси. Рекомендованный интервал концентраций составляет 1-5 мМ. Если концентрация Mg²⁺ слишком мала, выход ПЦР продукта будет снижаться. С другой стороны, при высокой концентрации Mg²⁺ может наблюдаться появление неспецифических продуктов и снижаться точность ПЦР. Если образец ДНК содержит ЭДТА или другие вещества, хелатирующие металлы, концентрация Mg²⁺ в реакционной смеси ПЦР должна быть повышена соответственно (связывание с ЭДТА происходит в соотношении 1:1).

Характеристики циклов амплификации

Начальная ДНК денатурация и активация фермента

Очень важно достигнуть полной денатурации ДНК-матрицы в начале ПЦР, что обеспечит её эффективное использование во время первого цикла амплификации. Если GC состав матрицы 50% и менее, достаточно начальной денатурации при 95 °С, в течение 1-3 мин.

Денатурация

Стандартным временем денатурации на цикл считается 30 сек при 95 °С. Для GC-богатых ДНК-матриц этот шаг может быть продлён до 3-4 мин.

Отжиг праймеров

Температура отжига праймеров должна быть на 5 °С ниже их температуры плавления (Tm). Общепринятое время отжига составляет 30 сек. Если наблюдается накопление неспецифических ПЦР-продуктов, температура отжига должна быть оптимизирована пошаговым повышением на 1-2 °С.

Элонгация

Оптимальная эффективность для Taq ДНК-полимеразы наблюдается в диапазоне температур 70-75 °С. Скорость синтеза Taq ДНК-полимеразы варьирует от 30 до 60 п.о.



в секунду в зависимости от сложности матрицы. В случае длинных матриц (более 2 т.п.о.) рекомендуется рассчитывать время элонгации исходя из соотношения 1 мин/т.о.

Количество циклов

Если имеется менее 10 копий ДНК-матрицы на реакцию, то для эффективной амплификации необходимо не менее 40 циклов. Для большего количества матрицы достаточно 25 - 35 циклов.

Финальная элонгация

После последнего цикла рекомендуется инкубировать ПЦР смесь дополнительно 5 -15 мин при 72 °С для достройки, возможно незавершенных, продуктов реакции. Если ПЦР-продукт будет клонирован в ТА-вектор, финальную элонгацию необходимо продлить до 30 мин для достижения максимальной эффективности формирования 3'-dA концов у ПЦР-продуктов.

Экзодеоксирибонуклеазная активность

ДНК была стабильна после инкубации 1 мкг фрагмента ДНК фага лямбда в присутствии 25 мкл **БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °С и 70 °С.

Рибонуклеазная активность

Отсутствие рибонуклеазной активности было подтверждено после инкубации 1 мкг 5'-[P³²] меченого фрагмента РНК в присутствии 25 мкл **БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °С.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Т/ф (383) 363-51-91

<http://www.biolabmix.ru>