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 SYBR Blue (2×)

Кат. номер FMHC030-400, FMHC030-2040

Описание

Реагент ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) разработан для проведения сублимационной сушки (лиофилизации) без дополнительной модификации и предназначен для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I. В реакционную смесь перед лиофилизацией могут быть добавлены праймеры 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 SYBR Blue входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР буфер;
- Mg^{2+} (3 мМ);
- SYBR Green I;
- инертный краситель;
- 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 SYBR Blue 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. Инертный краситель в составе ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) окрашивает её в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

10× ПЦР-вода в составе набора позволит работать с тугоплавкими и структурированными матрицами. С этой добавкой реакционная смесь становится аналогична смеси в классическом варианте фасовки (Кат. №

MHC030). Добавляя в реакционную смесь 10× ПЦР-воду, вы понижаете температуру плавления ДНК и праймеров, что может потребовать коррекции программы амплификации.

Состав набора

Каталожный номер	ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)	10× ПЦР-вода	Кол-во реакций по 25 мкл
FMHC030-400	4 × 1,25 мл	1 × 1,25 мл	400
FMHC030-2040	17 × 1,5 мл	3 × 1,8 мл	2040

Состав ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) при разведении в 0,5 мл воды:
125 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,5 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 3,2 мМ $MgCl_2$, 0,12 ед. акт./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,25% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, SYBR Green I, инертный краситель, криопротекторы.

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. Максимумы поглощения и испускания SYBR Green I 494 нм и 521 нм соответственно.

Инертный краситель

Инертный краситель в составе ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубой краски соответствует 615 нм.

Свойства реакционной смеси

- Реакционная смесь оптимизирована для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- Может быть лиофилизирована;

- Не теряет активности при разморозке/заморозке до 30 раз.
- 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;
- Смесь окрашена для облегчения раскапывания;
- 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 флуоресцентно-меченными зондами. Для таких приложений следует использовать ФармМастер HS-qPCR (2×). Для амплификаторов, использующих нормировку по ROX, используйте соответствующие модификации смеси (смотрите сайт https://biolabmix.ru/catalog/pcr).

Протокол проведения сублимационной сушки (лиофилизации)

Для лиофилизации HS-qPCR SYBR Blue (2×) рекомендуется использовать лиофильные сушилки (сублиматоры) с греющимися полками. Лиофилизацию 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	90	10-15
7	20	180	10-15

После лиофилизации **смесь** может быть легко восстановлена добавлением входящей в состав набора 10× ПЦР-воды и стерильной воды без нуклеаз (Кат. № SP010-05). При ресуспендировании можно менять кратность получаемой смеси объемом добавляемой воды. Лиофилизированную реакционную смесь и 10× ПЦР-воду 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-РВ с использованием 2× реакционной смеси **ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)** рекомендуем использовать следующий протокол:

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

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация
ФармМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)	**12,5**	**1×**
Прямой праймер	переменный	0,1-600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-600 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг-1 мкг
10× ПЦР-вода (опционально)	2,5 мкл	
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	3-5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	25-45
Отжиг	50-68	5-10 сек	
Элонгация	58-72	10-30 сек	
Кривая температур плавления	65-95		1

4. 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

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +4 °C – 3 недели; при -20 °C – 1 год; не более 30 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.
Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.