



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 SYBR Blue

Кат. номер LMHC030-200, LMHC030-900

Описание

Набор LyоМастер HS-qPCR SYBR Blue содержит лиофилизированную смесь LyоМастер HS-qPCR SYBR Blue, 10× ПЦР-воду и 50 мМ раствор MgCl₂. Лيوфилизированная смесь LyоМастер HS-qPCR SYBR Blue предназначена для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I. 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 SYBR Blue 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;
- 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 LyоМастер 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 LyоМастер 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. №

МНС030). Добавляя в реакционную смесь 10× ПЦР-воду, вы понижаете температуру плавления ДНК и праймеров, что может потребовать коррекции программы амплификации.

Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)	10× ПЦР-вода	50 мМ MgCl ₂	Кол-во реакций по 20 мкл
ЛМНС030-200	4 × 0,5 мл	1 × 0,4 мл	1 × 0,4 мл	200
ЛМНС030-900	18 × 0,5 мл	1 × 1,8 мл	1 × 1,8 мл	900

Состав **LyоМастер HS-qPCR SYBR Blue** при разведении в **0,5 мл воды**:

125 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 125 мМ КСl, 0,5 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 3 мМ MgCl₂, 0,12 ед. акт./мкл Таq ДНК-полимеразы, 0,25% Tween 20, стабилизаторы HS-Таq 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 Таq ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной HS-Таq ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*. Скорость продвижения Таq ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 2 т.п.о./мин. Рекомбинантная HS-Таq 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 LyоМастер 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 и интеркалирующим красителем;

- 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 SYBR Blue в течение 6 месяцев при комнатной температуре и 12 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 °С 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-мечеными зондами. Для таких приложений следует использовать LyoMaster HS-qPCR (2×). Для амплификаторов, использующих нормировку по ROX, используйте соответствующие модификации смеси (смотрите сайт <https://biolabmix.ru/catalog/pcr/color/>).

Протокол проведения амплификации

Ллиофилизированная форма реакционной смеси позволяет более гибко подходить к схеме её использования. Ниже представлено три варианта протоколов использования лиофилизированной смеси **LyoMaster HS-qPCR SYBR Blue: 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
LyоMaster HS-qPCR SYBR Blue (2x)/(4x)	10/5	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 20 мкл	

2. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

3. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	3-5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	
Отжиг	50-68	5-10 сек	25-45
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 °С, 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 +25 °С – до 6 месяцев; при +4 °С – до 12 месяцев; при -20°С - 18 месяцев.

Условия транспортировки

Допускается транспортировка при температуре окружающей среды в течение 14 суток, при этом, температура не должна превышать +30°С.