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
E-mail: sales@biolabmix.ru

БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×)

Кат. номер MHR032-400, MHR032-2040

Описание

Набор БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) содержит 2× реакционную смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR , 50 мМ раствор $MgCl_2$ и стерильную воду. Реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) предназначена для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I на амплификаторах, поддерживающих нормализацию данных по флуоресцентному красителю ROX. В состав БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- N-урацил-ДНК-гликозилаза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} (3,2 мМ);
- SYBR Green I;
- флуоресцентный краситель ROX (950 нМ);
- инертный краситель.

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с “горячим стартом” в режиме реального времени с образцами геномной, плазмидной и вирусной ДНК. Реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы, что позволяет повысить специфичность ПЦР и использовать матрицы со сложной пространственной структурой.

N-урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ) и дУТФ (в пропорции с дТТФ) обеспечивают надежную защиту от переноса ампликона между реакционными смесями (кросс-контаминации). ДНК-полимераза, входящая в состав БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×), неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °C в течение 5 мин.

Инертный краситель в составе смеси БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) окрашивает её в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

Смесь идеально подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX.

Состав набора

Кат. №	БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×)	50 мМ $MgCl_2$	Стерильная вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MHR032-400	4 × 1,25 мл	1 × 1 мл	4 × 1,25 мл	400
MHR032-2040	17 × 1,5 мл	1 × 1,8 мл	2 × 1,8 мл	2040

Состав БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×)

100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, смесь нуклеозидтрифосфатов (включая дУТФ), 3 мМ $MgCl_2$, 0,12 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,2% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, N-урацил-ДНК-гликозилаза, SYBR Green I, 950 нМ флуоресцентного красителя 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.н./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 детектируются при 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 ~ 621 нм).

Инертный краситель

Инертный краситель в составе БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубого красителя соответствует 615 нм.

Свойства реакционной смеси

- Реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии "горячий старт" и активируется после инкубации при 95 °C в течение 5 мин;
- Позволяет проводить нормировку по флуоресцентному красителю ROX;
  Присутствие дУТФ гарантирует встраивание уридина в каждую синтезированную цепь ДНК, УДГ способна удалять урацил из одно- и двух-цепочечных молекул ДНК;
- Реакционная смесь оптимизирована для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- Эффективность ПЦР сохраняется на протяжении всего срока хранения смеси, а также при многократном замораживании-размораживании.

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;
- Сокращение времени на подготовку реакции;
- Предотвращение повторной амплификации ПЦР-продуктов, попавших в реакционную смесь из другой смеси;
- Возможность нормировки данных;
- Стандартизация условий 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 Hi-ROX (2×) или БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX (2×).

Протокол проведения амплификации

1. Разморозить реакционную смесь и тщательно перемешать.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×)	12,5 мкл	1×
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. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	30-50
Отжиг	50-68	5-15 сек	
Элонгация	58-72	10-30 сек	
Кривая температур плавления	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.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °C – 7 дней; при +4 °C – 4 месяца; при -20 °C – 18 месяцев;
не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортируется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.