



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

БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x)

Кат. номер MHR021-400, MHR021-2040

Описание

Набор БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) содержит 2x реакционную смесь БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) и стерильную воду. 2x реакционная смесь БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) предназначена для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов на амплификаторах, поддерживающих нормализацию данных по флуоресцентному красителю ROX. В состав БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу, праймеры и зонд):

- высокопроцессивная рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} ;
- краситель ROX.

Смесь БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) 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 в ходе ПЦР. Реакционная смесь БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) 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.

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. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

| Каталожный номер | БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) | Вода | Кол-во реакций по 25 мкл |
|------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------|
| MHR021-400 | 4 × 1,25 мл | 4 × 1,25 мл | 400 |
| MHR021-2040 | 17 × 1,5 мл | 3 × 1,8 мл | 2040 |

Состав БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x)

100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,4 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 10 mM MgCl₂, 0,1 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы, 60 nM флуоресцентный краситель ROX.

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями. Для таких приложений следует использовать наборы БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x) или БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2x).

Область применения

- ПЦР с "горячим стартом" в режиме реального времени с применением флуоресцентно-меченых зондов и нормировкой данных по сигналу ROX;
- 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.

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).

Свойства реакционной смеси

- Реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии “горячий старт” и активируется после инкубации при 95 °С в течение 5 мин;
- Позволяет проводить нормировку по флуоресцентному красителю ROX;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2x) в течение месяца при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания.

Преимущества использования

- Фермент с “горячим стартом” повышает специфичность 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 и ошибки при смешивании компонентов ПЦР;
- Возможность нормировки данных;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах);
- Минимизируются трудозатраты.

Протокол выполнения 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 HS-qPCR Lo-ROX (2x) | 12,5 | 1x |
| 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 25 мкл | |

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу
4. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

| Шаг | Температура, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Предварительная денатурация | 95 | 5 мин | 1 |
| Денатурация | 95 | 5-15 сек | |
| Отжиг | 50-68 | 10-30 сек | 30-50 |
| Элонгация | 58-72 | 5-30 сек | |

Либо:

| Шаг | Температура, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Предварительная денатурация | 95 | 5 мин | 1 |
| Денатурация | 95 | 5-15 сек | 30-50 |
| Отжиг/ элонгация | 50-68 | 30-60 сек | |

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:

при +25 °С - 7дней; при +4 °С - 4 месяца; при -20 °С - 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.