

Информация о продукте

БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x)

Описание продукта

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

- высокопроцессивная рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР буфер;
- Mg²⁺;
- Краситель ROX.

Смесь **БиоМастер HS-qPCR Hi-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. **БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x)** реакционная смесь не содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

ДНК-полимераза, входящая в составе **БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x)** неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин.

Смесь идеально подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX: Life Technologies (ABI) 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne Plus. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

Кат. #	БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x)		Кол-во реакций по 25 мкл
	ROX (2x)	Вода	
MHR020-400	4 × 1.25 мл	4 × 1.25 мл	400
MHR020-2040	17 × 1.5 мл	3 × 1,8 мл	2040

Состав БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (2x)

100 mM Трис-НСI, pH 8.5, 100 mM КСI, 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, 0.9 мкМ 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 Hi-ROX SYBR Blue (2x)** или **БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-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 ~ 621nm).

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 Hi-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);

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 Hi-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, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	30 - 50
Отжиг	50 - 68	5-15 сек	
Элонгация	58 - 72	5-30 сек	

Либо:

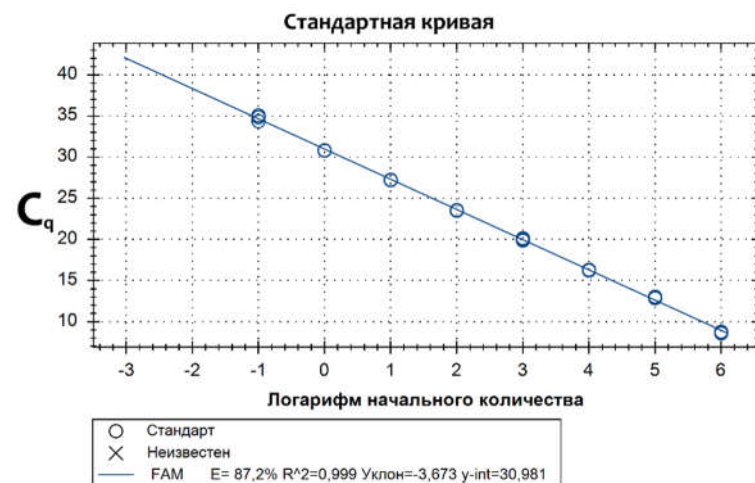
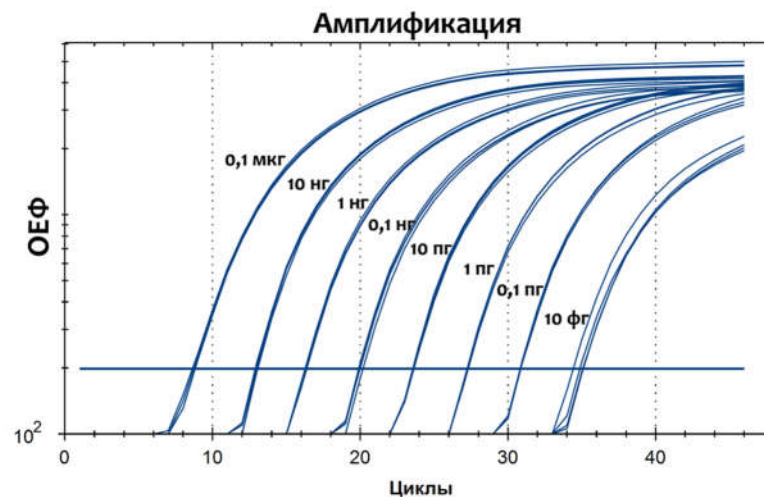
Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	30 - 50
Отжиг/элонгация	50 - 68	30-60 сек	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Хранение: 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.

Транспортировка: при 0 - +4 °C, допускается транспортировка при комнатной температуре до 3-х дней.

Область линейности системы БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX (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).

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, открывайте и пипетируйте ПЦР смесь, 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 и зондов рекомендуется использовать программу Oligo <http://www.oligo.net/> или аналоги. При отборе олигонуклеотидов соблюдайте следующие требования:

праймеры

- Длина 18-22 п.о.;
- Теоретические Tm между парой праймеров не должна отличаться более чем на 2 °С;
- Праймеры для проведения TaqMan ПЦР должны иметь Tm не менее 60 °С;
- GC состав праймеров в границах 40 – 60%;
- Длина продукта 70 – 150 п.о.;
- Минимизируйте вторичные структуры. Лучше их полное отсутствие.
- Проверяйте свои праймеры при помощи BLAST.

зонды

- Длина 22-26 п.о.;
- Температура плавления: 68-70°С.
- Минимум одинаковых нуклеотидов подряд (особенно G: не более 4-х подряд).
- Выбирайте ту цепь ДНК, на которой в пробе будет чаще встречаться С, чем G.
- На 5'-конце не должно быть G.
- Избегайте образование димеров зонда с праймерами и самокомплементарности.

Образцы ДНК

- Чистота и целостность ДНК очень важна для успешного проведения ПЦР. Для выделения образцов ДНК, используйте стандартные методики, позволяющие в дальнейшем проводить амплификацию;
- В процессе подготовки и работы с образцами максимально ограничивайте

использование ПЦР ингибиторов (фенол, гемин и др.). В случае очистки образцов в геле, минимизируйте воздействие УФ излучения, для предотвращения пиримидиновых димеров;

- Подготовку реакционной смеси проводите в чистой зоне, используйте наконечники для пипеток с фильтром для уменьшения вероятности контаминации;
- Оптимальное количество ДНК, используемое в реакции, зависит типа образца и его чистоты. Например, для ДНК фага лямбда ~ 0,1 нг; ДНК *E.Coli* ~ 10 нг; ДНК человека ~10 – 50 нг.

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 5 мин начальной денатурации при 95 °С.

Денатурация

Общепринятым временен денатурации на цикл в случае ПЦР в реальном времени считается 15 - 30 сек при 95 °С.

Отжиг праймеров и элонгация

Для TaqMan формата ровередения ПЦР в реальном времени стадия отжига и элонгации как правило объединяется в одну стадию с температурой 58-60 °С и длительностью 60 сек.

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.

Экзодеоксирибонуклеазная активность

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

