



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 UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x)**

Кат. номер MHR032-400, MHR032-2040

### **Описание**

Набор БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) содержит 2x реакционную смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x), 50 мМ раствор MgCl<sub>2</sub> и стерильную воду. 2x реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2x) предназначена для проведения количественного 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 (2x) 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<sup>2+</sup> (3 мМ);
- SYBR Green I;
- флуоресцентный краситель ROX;
- 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 (2x) 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 (2x), неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин.

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

Смесь идеально подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX: Life Technologies (ABI) 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne Plus.

## Состав набора

| Каталожный номер | БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2*) | 50 мМ MgCl <sub>2</sub> | 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 мМ Трис-HCl, pH 8,5, 100 мМ KCl, смесь нуклеозидтрифосфатов (включая дУТФ), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,12 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, N-урацил-ДНК-гликозилаза, SYBR Green I, 0,9 мкМ флуоресцентный краситель 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 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-PB) без необходимости использования специфических 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 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 ( $E_m \sim 621 \text{ nm}$ ).

### **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 голубой краски 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;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение БиоМастер UDG HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) в течении месяца при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания.

### **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;
- Предотвращает повторную амплификацию ПЦР-продуктов, попавших в реакционную смесь из другой смеси;
- Возможность нормировки данных;
- 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 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 (2x) | 12,5       | 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 25 мкл  |                       |

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

| Шаг                            | Температура, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Антиконтаминационная обработка | 50              | 2 мин           | 1                 |
| Предварительная денатурация    | 95              | 5 мин           | 1                 |
| Денатурация                    | 95              | 5-15 сек        |                   |
| Отжиг                          | 50-68           | 5-15 сек        | 30-50             |
| 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 °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 - 7 дней; 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.