

1974.0200 Экстра-микс для количественной ПЦР в режиме реального времени HS-qPCR SYBR Blue, 200 реакций, Диаэм

1974.1020 Экстра-микс для количественной ПЦР в режиме реального времени HS-qPCR SYBR Blue, 1020 реакций, Диаэм

Описание продукта

Экстра-микс HS-qPCR SYBR Blue предназначен для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I и представляет собой 2-кратную реакционную смесь, содержащую все компоненты, необходимые для проведения ПЦР в режиме реального времени (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивную рекомбинантную HS-Taq ДНК-полимеразу с «горячим» стартом,
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов,
- ПЦР-буфер,
- Mg^{2+} (3 мМ),
- интеркалирующий краситель SYBR Green I
- инертный краситель

Экстра-микс HS-qPCR SYBR Blue оптимизирован для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени. В его состав входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность **HS-Taq** ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР, а также вещества, влияющие на температуру отжига праймеров и характеристики плавления матрицы, что позволяет повысить специфичность ПЦР и использовать матрицы со сложной пространственной структурой. Инертный краситель в составе **Экстра-микса HS-qPCR SYBR Blue** окрашивает его в голубой цвет (максимум поглощения – 615 нм) и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

SYBR Green I - флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени. SYBR Green I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов 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 - 494 нм и 521 нм, соответственно, что позволяет использовать его со всеми известными на сегодняшний день амплификаторами для проведения ПЦР в режиме реального времени.

HS-Taq ДНК-полимераза, входящая в состав **экстра-микса**, неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин. П 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.н./мин. Рекомбинантная **HS-Taq** ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.н.

Кроме **экстра-микса**, в состав набора также включены 50 мМ $MgCl_2$ и стерильная вода. Входящий в набор раствор $MgCl_2$ позволяет легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему «матрица-праймеры». Форма реагентов для проведения ПЦР в виде экстра-микса экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав Экстра-микса HS-qPCR SYBR Blue:

- 100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С)
- 100 мМ КСl
- 0.4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата

- 3 мМ MgCl₂
- 0.06 ед. акт./мкл Таq ДНК-полимеразы
- 0.025 % Tween 20
- стабилизаторы HS-Таq ДНК-полимеразы
- SYBR Green I
- инертный краситель

Состав набора

Кат. №	Кол-во реакций по 50 мкл	HS-Таq qPCR SYBR Blue(2x)	50 мМ MgCl ₂	Вода
1974.0200	200	4 x 1,25 мл	1 x 1 мл	4 x 1.25 мл
1974.1020	1020	17 x 1,5 мл	2 x 1,8 мл	

Преимущества использования экстра-микса

- Фермент с “горячим” стартом повышает специфичность, чувствительность и выход реакции.
- Для активации HS-Таq ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин.
- 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).
- Инертный краситель облегчает пробоподготовку при постановке ПЦР

Область применения:

- ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I
- Обычная ПЦР

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-мечеными зондами. Для таких приложений следует использовать **Экстра-микс HS-qPCR (2x)**.

Срок хранения и транспортировка:

1 год при -20 °С; не более 50 циклов замораживания- размораживания.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте реакционную смесь, тщательно перемешайте. Не рекомендуется перемешивать на Вортексе.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
HS-qPCR SYBR Blue (2x)	25 мкл	1x
Прямой праймер	переменный	0.1 – 0.6 мкМ
Обратный праймер	переменный	0.1 – 0.6 мкМ
ДНК-матрица	переменный	10 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 50 мкл	

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.
4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 сек	25-40
Отжиг	50 - 68	10-30 сек	
Элонгация	58 - 72	30-60 сек	
Кривая температур плавления (рекомендуется)			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 T_{m1} ниже, чем T_{m2} целевого продукта, то мониторинг реакции проводят при температуре в диапазоне между T_{m1} и T_{m2} .