

**1958.0500** Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, ПЦР-буфер с 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 500 ед полимеразы, Диаэм

**1958.2250** Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, ПЦР-буфер с 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2250 ед полимеразы, Диаэм

### *Описание продукта*

**Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start (+MgCl<sub>2</sub>)** содержит рекомбинантную **HS-Taq** ДНК-полимеразу и растворы всех необходимых компонентов для проведения стандартной ПЦР с “горячим” стартом (за исключением матрицы ДНК и праймеров). ПЦР-буфер, входящий в состав набора, уже содержит MgCl<sub>2</sub> в концентрации 10 мМ, достаточной для постановки большинства рутинных ПЦР.

**HS-Taq** ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную *Taq* ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. **HS-Taq** ДНК-полимераза не активна при температуре до +70 °С. Это позволяет избежать образования неспецифических продуктов и праймер-димеров при низкой температуре на стадии смешивания компонентов ПЦР-смеси. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР путём инкубации в течение 5 мин при +95 °С. Рекомбинантная *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. **HS-Taq** ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.н.; она обладает способностью присоединять адениновый остаток к 3'-концу синтезируемой цепи, поэтому продукты ПЦР могут использоваться для ТА-клонирования.

**5× ПЦР-буфер (+MgCl<sub>2</sub>)** оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР. В состав буфера входят MgCl<sub>2</sub> (10 мМ) и добавки, повышающие время полужизни и процессивность **HS-Taq** ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы. Входящие в набор 50 мМ раствор MgCl<sub>2</sub> и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему «матрица-праймеры», а **6× Буфер для нанесения на гель** облегчает пробоподготовку для электрофореза ПЦР-продуктов и контроль над ходом электрофореза.

## Состав набора

| Кат. #    | <i>HS-Taq</i> DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл* | 5× ПЦР буфер (+MgCl <sub>2</sub> ) | 50 мМ MgCl <sub>2</sub> | 50× смесь dNTP (10 мМ каждого) | 6×буфер для нанесения на гель | Кол-во, ед. акт. |
|-----------|---|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|
| 1958.0500 | 1 × 100 мкл                                   | 2 × 1.5 мл                         | 1 × 1 мл                | 2 × 200 мкл                    | 1 × 1.5 мл                    | 500              |
| 1958.2250 | 3 × 150 мкл                                   | 8 × 1.5 мл                         | 2 × 1 мл                | 4 × 400 мкл                    | 3 × 1.5 мл                    | 2250             |

\* За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее включение 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимый продукт за 30 мин при 74 °С. Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl, рН 9.0 (при 25 °С), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [<sup>3</sup>H] dTTP, 0,25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

### **Буфер для хранения *HS-Taq* ДНК-полимеразы:**

50 мМ Трис-НСl, рН 8.0 (при 25 °С), 50 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 1мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 1% (v/v) Тритон X-100.

### **5× ПЦР буфер (+MgCl<sub>2</sub>):**

50 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы *Taq* ДНК-полимеразы.

### **Область применения:**

- ПЦР с “горячим” стартом.
- Высокопроизводительная ПЦР.
- Обычная ПЦР с высокой воспроизводимостью.
- Нарботка ПЦР-продуктов для ТА клонирования.
- Вторая стадия ОТ-ПЦР.

### **Ограничения к использованию:**

- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 тыс. п.н.

### **Ингибирование и инактивация**

Ингибиторы: ионные детергенты (дезоксихолат натрия, саркозил и додецилсульфат натрия (SDS) в концентрациях выше, чем 0.06, 0.02 и 0.01%, соответственно).

Инактивируется экстракцией смесью фенол/хлороформ.

**Хранение и транспортировка:** при -20 °С; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

## Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте компоненты ПЦР-смеси и тщательно перемешайте на вортексе (кроме **HS-Taq** ДНК-полимеразы). В случае формирования осадка в буфере нагрейте пробирку до 50 °С и перемешайте до полного его растворения.

2. Приготовьте реакционную смесь для ПЦР из расчёта «количество реакций + одна», смешав воду, буфер, смесь dNTP, праймеры и **HS-Taq** ДНК-полимеразу.

### Объёмы компонентов ПЦР-смеси для 1 реакции объёмом 50 мкл

| Компонент                                    | Объем      | Конечная концентрация |
|--|------------|-----------------------|
| <b>5× ПЦР буфер</b>                          | 10 мкл     | 1×                    |
| <b>50× смесь dNTP</b>                        | 1 мкл      | 0.2 мМ каждого        |
| <b>50 мМ MgCl<sub>2</sub>*</b>               | переменный | 1-5 мМ                |
| <b>Прямой праймер</b>                        | переменный | 0.1-0.5 мкМ           |
| <b>Обратный праймер</b>                      | переменный | 0.1-0.5-мкМ           |
| <b>ДНК-матрица</b>                           | переменный | 10 пг – 1 мкг         |
| <b>HS-Taq DNA полимеразы, 5 ед. акт./мкл</b> | 0.25 мкл   | 1.25 ед. акт./проба** |
| <b>Стерильная вода</b>                       | до 50 мкл  |                       |

\*буфер 5× ПЦР буфер (+MgCl<sub>2</sub>) уже содержит 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (конечная концентрация 2 мМ)

\*\* Для ампликонов длиной более 3 тыс. п.н. рекомендуется добавлять 2.5-5 ед. полимеразы на 50 мкл реакционной смеси

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

4. Аликвотируйте реакционную смесь в индивидуальные ПЦР-пробирки и затем добавьте ДНК-матрицу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

5. Поместите пробирки с реакционной смесью в амплификатор и проведите ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

| Шаг  | Температура, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|--|-----------------|-----------------|-------------------|
| <b>Предварительная денатурация и активация HS-Taq ДНК-полимеразы</b> | 95              | 5 мин           | 1                 |

|                     |                     |                |         |
|---------------------|---------------------|----------------|---------|
| Денатурация         | 95                  | 15 – 30 сек    |         |
| Отжиг               | 50 – 68 (Tm - 5°C)* | 15 - 30 сек    | 25 - 40 |
| Элонгация           | 72                  | 1 мин/тыс.п.н. |         |
| Финальная элонгация | 72                  | 5 – 15 мин     | 1       |

\*Tm - температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой:

$$T_m (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$

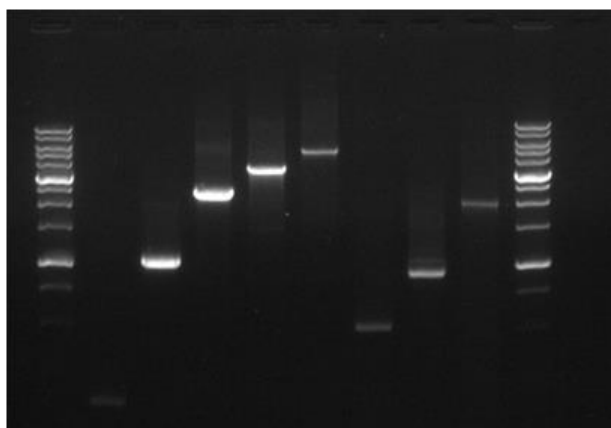
6. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с **Буфером для нанесения** и наносятся на гель. Для анализа продуктов реакции рекомендуется электрофорез в агарозном геле с ТАЕ-буфером.

#### Подвижность красителей в 0,5 – 1,5% агарозном геле

| Ксилен цианол     | Бромфеноловый синий | Orange G  | Тартразин |
|-------------------|---------------------|-----------|-----------|
| 10000 – 4000 п.н. | 500-400 п.н.        | <100 п.н. | <20 п.н.  |

#### Результаты амплификации ДНК с использованием Набора для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl<sub>2</sub>)

L 1 2 3 4 5 6 7 8 L



Дорожка L – маркер ДНК от 250 до 10000 п.н. Дорожки 1-5 – амплификация фрагментов ДНК фага λ длиной 175, 1000, 2000, 3500 и 5000 п.н., соответственно. Дорожки 6-8 – амплификация фрагментов геномной ДНК человека длиной 500, 900 и 2000 п.н., соответственно.