

1957.0500 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, 500 ед полимеразы, Диаэм

1957.2250 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, 2500 ед полимеразы, Диаэм

Описание продукта

Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой Hot Start содержит рекомбинантную **HS-*Taq*** ДНК-полимеразу и растворы всех необходимых компонентов для проведения стандартной ПЦР с “горячим” стартом (за исключением матрицы ДНК и праймеров). В состав набора входят: раствор **HS-*Taq*** ДНК-полимеразы (5 ед. акт./мкл), 5× ПЦР буфер, 50 мМ MgCl₂, 50× смесь dNTP и 6× буфер для нанесения на гель. Все реагенты высокого качества и оптимизированы для проведения ПЦР.

HS-*Taq* ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную *Taq* ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. **HS-*Taq*** ДНК-полимераза неактивна 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 5-минутной инкубации 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. Рекомбинантная **HS-*Taq*** ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.н. и обладает способностью присоединять адениновый остаток к 3'-концу синтезируемой цепи ДНК, поэтому ПЦР-фрагменты пригодны для ТА-клонирования.

5× ПЦР-буфер оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР (**не содержит MgCl₂**). В состав буфера входят 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 MgCl₂ 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. # | HS-Taq ДНК-полимераза, 5 ед. акт./мкл* | 5× ПЦР-буфер | 50 мМ MgCl ₂ | 50× смесь dNTP (10 мМ каждого) | 6× буфер для нанесения на гель | Кол-во, ед. акт. |
|-----------|--|--------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
| 1957.0500 | 1 × 100 мкл | 2 × 1,5 мл | 1 × 1 мл | 2 × 200 мкл | 1 × 1,75 мл | 500 |
| 1957.2250 | 3 × 150 мкл | 8 × 1,5 мл | 2 × 1 мл | 4 × 400 мкл | 3 × 1.75 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 MgCl₂, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [³H] 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:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 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 т.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 набора и тщательно перемешайте на вортексе (кроме **HS-Taq** ДНК-полимеразы).

Примечание: 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, MgCl₂, праймеры и **HS-Taq** ДНК-полимеразу.

Объёмы компонентов ПЦР-смеси для 1 реакции объёмом 50 мкл

| Компонент | Объем | Конечная концентрация |
|--|--------------|------------------------------|
| 5× ПЦР буфер | 10 мкл | 1× |
| 50× смесь dNTP | 1 мкл | 0.2 мМ каждого |
| 50 мМ MgCl₂ | переменный | 1-5 мМ |
| Прямой праймер | переменный | 0,1 – 300 нМ |
| Обратный праймер | переменный | 0,1 – 300 нМ |
| ДНК-матрица | переменный | 10 пг – 1 мкг |
| HS-Taq DNA полимеразы, 5 ед. акт./мкл | переменный | 1.25 ед. акт.* |
| Стерильная вода | до 50 мкл | |

* 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 |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| Предварительная денатурация | 95 | 5 мин | 1 |
| Денатурация | 95 | 15 – 30 сек | |

| | | | |
|----------------------------|----------------|--------------|---------|
| Отжиг | 50 – 68 (Tm-5) | 15 - 30 сек | 25 - 40 |
| Элонгация | 72 | 1 мин/т.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:

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

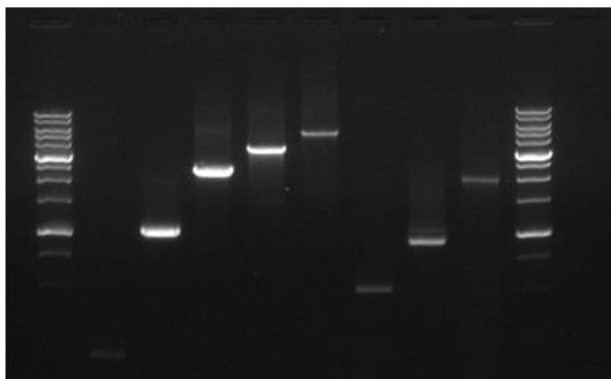
6. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с **Буфером для нанесения** и наносятся на гель. Для анализа продуктов реакции рекомендуется электрофорез в агарозном геле с TAE-буфером.

Подвижность красителей в 0.5 – 1.5% агарозном геле

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

Результаты амплификации ДНК с использованием набора для проведения ПЦР с HS-Taq

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.