

1959.0500 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start расширенный (3 ПЦР-буфера), 500 ед полимеразы, Диаэм

1959.2500 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start расширенный (3 ПЦР-буфера), 2500 ед полимеразы, Диаэм

Описание продукта

Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start расширенный содержит рекомбинантную **HS-Taq** ДНК-полимеразу, три реакционных буфера (**10× ПЦР буфер**, **5× Green буфер** и **5× GC буфер**), а также другие компоненты, необходимые для проведения ПЦР (за исключением матрицы ДНК и праймеров).

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 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. Рекомбинантная **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.

10× ПЦР буфер оптимизирован для проведения большинства видов ПЦР, в том числе для проведения ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующими красителями или флуоресцентными зондами. Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы.

5× Green буфер содержит маркерные красители (сине-зелёный и желтый) и добавки, увеличивающие плотность раствора, для удобного нанесения на гель. Предназначен для стандартной ПЦР с оценкой выхода продуктов по конечной точке (методом разделения продуктов в геле). Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы.

5× GC буфер предназначен для амплификации участков ДНК, богатых GC и/или имеющих сложную пространственную структуру. Буфер химически стабилен, содержит вещества, меняющие температуру отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

В состав всех буферов входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность *Taq* ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. Все буферы в условиях разбавления до 1× (однократного) содержат 1.5 мМ MgCl₂. Входящие в набор 50 мМ раствор MgCl₂ и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему «матрица-праймеры». **6× Буфер для нанесения на гель** облегчает пробоподготовку для электрофореза ПЦР-продуктов и контроль над ходом электрофореза.

Состав набора

Компонент	Кат. #	
	1959.0500	1959.2500
<i>HS-Taq</i> DNA-полимераза, 5 ед. акт./ мкл*	1 × 100 мкл	2 × 250 мкл
10× ПЦР буфер	1 × 1.5 мл	3 × 1.8 мл
5× Green буфер	2 × 1.5 мл	5 × 1.8 мл
5× GC буфер	2 × 1.5 мл	5 × 1.8 мл
50 мМ MgCl ₂	1 × 1 мл	2 × 1 мл
50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	2 × 200 мкл	2 × 800 мкл
6× буфер для нанесения на гель	1 × 1 мл	1 × 1.8 мл

* 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 телят.

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.

10× ПЦР буфер:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 500 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы *Taq* ДНК-полимеразы.

5× Green буфер:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 7,5 мМ MgCl₂, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы *Taq* ДНК-полимеразы, маркерные красители.

5× GC буфер:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 7.5 мМ MgCl₂, 0.5% (v/v) Tween 20, ДМСО, 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.
- ПЦР GC-богатых и сложно-структурированных участков ДНК.

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
5× (10×) ПЦР буфер	10 (5) мкл	1×
50× смесь dNTP	1 мкл	0.2 мМ каждого
50 мМ MgCl₂*	переменный	1-5 мМ
Прямой праймер	переменный	0.1-0.5 мкМ
Обратный праймер	переменный	0.1-0.5 мкМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
HS-Taq DNA полимеразы, 5 ед. акт./мкл	0.25 мкл	1.25 ед. акт./проба**
Стерильная вода	до 50 мкл	

*все буферы, входящие в набор, уже содержат 10 мМ MgCl₂ (конечная концентрация в 1-кратной ПЦР-смеси 1.5 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
Предварительная денатурация и активация HS-Taq ДНК-полимеразы	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 – 30 сек	
Отжиг	50 – 68 (T _m - 5°C)*	15 - 30 сек	25 - 40
Элонгация	72	1 мин/тыс.п.н.	
Финальная элонгация	72	5 – 15 мин	1

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

$$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$

В случае использования **5× GC** буфера, возможно, потребуется снизить T_m на 2-5°C из-за присутствия веществ, влияющих на образование комплекса праймер/матрица.

6. Метод анализа результатов ПЦР зависит от типа реакции (в режиме реального времени или по конечной точке). При использовании **5×Green** буфера можно проводить анализ с помощью электрофореза в геле без дополнительной пробоподготовки. Если ПЦР (по конечной точке) проводилась в **10× ПЦР** буфере или **5× GC** буфере, рекомендуется добавить к пробам **6× буфер для нанесения на гель**.