

## Информация о продукте

### БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)

#### Описание продукта

Набор **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)** предназначен для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0,2 до 20 т.п.о. с высокой точностью, для последующего клонирования или секвенирования. Набор содержит 2× реакционную смесь **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)**, ДМСО, стерильную воду и буфер для нанесения (6×) на гель. Реакционная смесь **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)** также идеально подходит для амплификации GC-богатых (>65%) и сложных участков ДНК. В состав реакционной смеси **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)** входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- смесь полимераз (Pfu и HS-Taq),
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов,
- ПЦР-буфер,
- Mg<sup>2+</sup>.

Смесь **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)** содержит комбинацию из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной Pfu ДНК-полимеразы с корректирующей активностью и HS-Taq ДНК-полимеразы. Смесь полимераз малоактивна при комнатной температуре.

Сочетание полимераз позволило повысить скорость амплификации по сравнению с Pfu ДНК-полимеразой до 1 kb/70 сек и сохранить её точность. Совместное использование двух ферментов дает возможность нарабатывать ПЦР-продукты до 20 т.п.о. Продукты, полученные с помощью **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)**, преимущественно не содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании по «тупым» концам.

Буфер, оптимизированный для эффективной работы обеих полимераз, обеспечивает высокий выход продукта. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

#### Состав набора

Кат. #	БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)	Вода	ДМСО	Буфер для нанесения (6×)	Кол-во реакций по 50 мкл
MN041-100	2 × 1.25 мл	2 × 1.25 мл	1 × 0,2 мл	1 × 0.5 мл	100
MN041-400	6 × 1.67 мл	2 × 1,8 мл	1 × 0,5 мл	1 × 1 мл	400

#### Состав БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×):

100 мМ Трис-HCl, pH 8.9 (при 25 °C), 100 мМ KCl, 0.8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.1 ед. акт./мкл смеси ферментов, 0.2% Tween 20, стабилизаторы ДНК-полимераз.

#### Область применения:

- Высокоточная ПЦР для получения длинных фрагментов (“High-Fidelity” ПЦР)
- Получение продуктов для клонирования и секвенирования
- Амплификация GC-богатых и сложных матриц.

#### Свойства смеси полимераз

Смесь ДНК-полимераз специально разработана для эффективной амплификации фрагментов ДНК от 0,2 до 20 т.п.о. с различных матриц. Полученная смесь обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной, 5'-3' экзонуклеазной и 3'-5' экзонуклеазной (корректирующей) активностями. Скорость синтеза второй цепи ДНК составляет примерно 1 kb/70 сек.

#### Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq и Pfu ДНК-полимераз;
- Состав смеси обеспечивает возможность длительного хранения (хранение **БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)** в течение 7 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР) и многократного замораживания-размораживания (более 50 раз);

#### Преимущества использования

- Амплификация длинных фрагментов: до 20 т.п.о. с ДНК вирусов до 10 т.п.о. с геномной ДНК;
- Повышенная точность амплификации по сравнению с Taq ДНК-полимеразой.
- Сокращение времени на подготовку реакции.
- Амплификация широкого спектра ДНК- матриц.
- Снижение вероятности контаминации при смешивании компонентов ПЦР.
- Возможность ТА клонирования продуктов ПЦР за счет дезоксирибоаденозиновых остатков, выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК.

#### Протокол выполнения амплификации

1. Разморозить реакционную смесь, осторожно и тщательно перемешать.
2. Взять тонкостенные пробирки для ПЦР и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
<b>БиоМастер Hi-Fi LR ПЦР (2×)</b>	25	1×
<b>Прямой праймер</b>	переменный	0,1 – 800 нМ
<b>Обратный праймер</b>	переменный	0,1 – 800 нМ
<b>ДНК-матрица</b>	переменный	1 – 500 нг
<b>Стерильная вода</b>	до 50 мкл	

*Примечание:* в случае необходимости добавить ДМСО от 1 до 5% от конечного объема реакционной смеси. При этом учитывайте изменение T<sub>m</sub> праймеров при составлении программы.

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

*Примечание:* в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавить в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

4. При амплификации фрагмента до 5 т.п.о. можно использовать стандартную трехшаговую программу. Для амплификации продуктов более 5 т.п.о. рекомендуем следующие режимы (при выборе программы амплификации, пожалуйста, ознакомьтесь с рекомендациями по её оптимизации).

Трехшаговая программа для ампликонов более 5 т.п.о.:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	92-94	2-4 мин	1
Денатурация	92-94	10-20 сек	10
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	30 сек	
Элонгация	68	х мин.	
Денатурация	94	10-20 сек	15-20
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	30 сек	
Элонгация	68	х (+10 сек/цикл) мин.	
Финальная элонгация	68	5 – 15 мин	1

Tm - температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой: Tm (°C) = 2 x (A+T) + 4 x (G+C).

Двухшаговая программа

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	92-94	2-4 мин	1
Денатурация	92-94	10-20 сек	10
Отжиг/ Элонгация	68	х мин.	
Денатурация	94	10-20 сек	15-20
Отжиг/ Элонгация	68	х (+10 сек/цикл) мин.	
Финальная элонгация	68	5 – 15 мин	1

х – время элонгации зависит от длины амплифицируемой последовательности:

Размер ампликона, т.п.о.	3	6	10	15	20
Время элонгации, мин	3,5	7	12	18	24

5. После проведения ПЦР анализ продуктов амплификации проводится разделением в гель-электрофорезе с последующим окрашиванием.

*Примечание:* 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.

**Хранение:** в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 месяца; при -20°С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

**Транспортировка:** при 0 - +4 °С, допускается транспортировка при комнатной температуре до 3-х дней.