



Общество с ограниченной ответственностью

«Биолабмикс»

ИНН 5408278957 КПП 540801001

630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,

ул. Инженерная, дом № 28

Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40

E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl₂)

Кат. номер КН016-500, КН016-2250

Описание

Набор для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl₂) 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 (+MgCl₂), 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 замешивания ПЦР. Активация осуществляется на первом цикле при короткой 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 2 т.п.о./мин. Рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.о.

5× ПЦР буфер (+MgCl₂) оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР. В состав буфера входят MgCl₂ (7,5 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 MgCl₂ и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакцию под конкретную систему матрица-праймеры, а 6× буфер для нанесения на гель облегчает пробоподготовку для анализа в геле и контроль над ходом электрофореза.

Состав набора

Каталожный номер	HS-Taq DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл*	5× ПЦР буфер (+MgCl ₂)	50 мМ MgCl ₂	50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	Буфер для нанесения (6×)	Кол-во, ед. акт.
КН016-500	1 × 100 мкл	2 × 1,5 мл	1 × 1 мл	2 × 200 мкл	1 × 1,5 мл	500
КН016-2250	3 × 150 мкл	8 × 1,5 мл	2 × 1 мл	2 × 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 MgCl₂, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [³H] dTTP, 0,25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

Буфер хранения

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 (+MgCl₂)

50 мМ Трис-НСl, рН 8,5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 7,5 мМ MgCl₂, 0,5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы.

Область применения

- ПЦР с "горячим стартом";
- высокопроизводительная ПЦР;
- обычная ПЦР с высокой воспроизводимостью;
- наработка ПЦР-продуктов для ТА-клонирования;
- ОТ-ПЦР.

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 т.п.о.

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.

Протокол выполнения амплификации

Приготовьте несколько параллельных реакций и минимизируйте возможную ошибку пипетирования. Приготовьте реакционную смесь ПЦР смешав воду, буфер, смесь dNTP, праймеры и HS-Taq ДНК-полимеразу. Приготовьте реакционную смесь в расчёте на количество реакций плюс одна. Аликвотируйте реакционную смесь ПЦР в индивидуальные ПЦР пробирки и затем добавьте ДНК-матрицу.

1. Разморозьте реакционную смесь и осторожно перемешайте.

2. В пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
5× ПЦР буфер (+MgCl ₂)	10 мкл	1×
50× смесь dNTP	1 мкл	0,2 мМ каждого
50 мМ MgCl ₂ *	переменный	2-5 мМ
Прямой праймер	переменный	0,1-600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-600 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг-1 мкг
HS-Taq DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл	переменный	1-5 ед. акт
Стерильная вода	До 50 мкл	

*буфер 5× ПЦР буфер (+MgCl₂) уже содержит 7,5 мМ MgCl₂ (конечная концентрация 1,5 мМ)

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

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

Примечание: Готовую реакционную смесь следует быстро переместить в предварительно прогретый до 95 °С амплификатор.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	
Отжиг	50-68 (Tm-5)	5-20 сек	25-40
Элонгация	72	0,5-1 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:

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

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с буфером для нанесения и наносятся на гель.

Примечание: для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1× TAE буфер с бромистым этидием.

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.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °С - 7 дней; при +4 °С - 4 месяца; при -20 °С - 18 месяцев;
не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортируется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.