



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

Расширенный набор для проведения ПЦР с HS-Taq

Кат. номер КН018-500, КН018-2500

Описание

Расширенный набор для проведения ПЦР с HS-Taq содержит рекомбинантную HS-Taq ДНК-полимеразу, три реакционных буфера и другие необходимые компоненты для проведения ПЦР, за исключением матрицы ДНК и праймеров. В состав набора входят:

- рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза (5 ед. акт./мл);
- 10× ПЦР буфер;
- 5× Green буфер;
- 5× GC буфер;
- 50 мМ MgCl₂ (в отдельной пробирке);
- 50× смесь dNTP;
- буфер для нанесения (6×).

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-и 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.

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 разработан 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 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 mM MgCl₂.

Входящие в набор 50 mM раствор MgCl₂ и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему матрица-праймеры.

Состав набора

Компонент	Каталожный номер (количество)	
	K018-500 (500 ед. акт.)	K018-2500 (2500 ед. акт.)
HS-Taq 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 mM MgCl ₂	1 × 1 мл	2 × 1 мл
50× смесь dNTP (10 mM каждого)	2 × 200 мкл	2 × 800 мкл
Буфер для нанесения (6×)	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 mM Трис-НСl, pH 9,0 (при 25 °С), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 200 mM dATP, 200 mM dCTP, 200 mM dGTP, 50 mM [³H] dTTP, 0,25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

Буфер хранения

50 mM Трис-НСl, pH 8,0 (при 25°С), 50 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 1mM дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 1% (v/v) Тритон X-100.

10× PCR buffer

100 mM Трис-НСl, pH 8,5 (при 25 °С), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы.

5× Green буфер

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

5× GC буфер

100 mM Трис-НСl, pH 8,5 (при 25 °С), 250 mM KCl, 7,5 mM 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;
- наработка 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 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. Реакционную смесь необходимо приготовить в расчёте на нужное количество реакций плюс одна. Перенесите аликвоты реакционной смеси ПЦР в индивидуальные пробирки и затем добавьте ДНК-матрицу.

1. Разморозить реакционную смесь и осторожно перемешать.

Примечание: в случае образования осадка в буфере нагреть пробирку до 50°C и перемешать до полного его растворения.

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

Компонент	Объем	Конечная концентрация
10 (5)× ПЦР буфер	5 (10) мкл	1×
50× смесь dNTP	1 мкл	0,2 мМ каждого
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	

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. Провести 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)	10-20 сек	25-50
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	72	5-15 мин	1

Tm – температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой: $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

Примечание: в случае использования 5× GC буфера, возможно, потребуется снизить Tm на 2 – 5 °С из-за присутствия веществ, влияющих на образование комплекса праймер/матрица.

5. Метод анализа результатов ПЦР зависит от типа реакции (в режиме реального времени или по конечной точке). При использовании 5× Green буфер анализ проводится с помощью электрофореза в геле без дополнительной пробоподготовки.

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

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.