

Информация о продукте

БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)

Описание продукта

Набор **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** содержит 2x реакционную смесь **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)**, 50 мМ MgCl₂ и стерильную воду. 2x реакционная смесь **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** предназначена для проведения ПЦР-анализа большого количества образцов. В состав **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** реакционной смеси входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивная рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза,
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов,
- ПЦР-буфер
- Mg²⁺,
- красители.

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с “горячим” стартом. В состав смеси входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность *HS-Taq* ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** реакционная смесь химически стабильна, инертна и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы. ДНК-полимераза, входящая в её состав, неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин. Входящий в набор раствор MgCl₂ позволяет легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему матрица-праймеры. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования. Добавленные красители и повышенная вязкость раствора позволяют наносить реакционную смесь сразу на гель.

Состав набора

Кат. #	БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)	50 мМ MgCl ₂	Вода	Кол-во реакций по 50 мкл
МНС010-200	4 × 1.25 мл	1 × 1 мл	4 × 1.25 мл	200
МНС010-1020	17 × 1.5 мл	1 × 1,8 мл	2 × 1,8 мл	1020

Состав БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x):

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 100 мМ КСl, 0.4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 0.06 ед. акт./мкл *Taq* ДНК-полимеразы, 0.2% Tween 20, стабилизаторы *HS-Taq* ДНК-полимеразы и красители.

Область применения:

- ПЦР с “горячим” стартом
- Высокопроизводительная ПЦР
- Обычная ПЦР с высокой воспроизводимостью
- Нарботка ПЦР-продуктов для ТА клонирования
- ОТ-ПЦР

Свойства полимеразы

Рекомбинантная *HS-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.о./мин. Рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.о.

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной работы *HS-Taq* ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** в течении 30 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания;
- Смесь содержит красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель.

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.

Преимущества использования

- Фермент с “горячим” стартом повышает специфичность, чувствительность и выход реакции.
- Для активации *HS-Taq* ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин.
- Сокращается время на подготовку реакции.
- Снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов ПЦР.
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).
- Облегчается стадия нанесения на гель. Благодаря высокой плотности смеси добавления в пробу буфера для нанесения не требуется.
- Возможность ТА клонирования продуктов ПЦР за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков.

Ограничения к использованию

- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 т.п.о.
- Из-за содержания красителя смесь **БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** не может использоваться для ПЦР в режиме реального времени и других приложений, требующих измерения оптического поглощения или флуоресценции пробы. Для таких приложений следует использовать смесь **БиоМастер qPCR (2x)** и **БиоМастер qPCR SYBR Blue (2x)**.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте реакционную смесь, осторожно и тщательно перемешайте.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)	25	1x
Прямой праймер	переменный	0,1 - 300 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 - 300 нМ
ДНК-матрица	переменный	10 пг - 1 мкг
Стерильная вода	до 50 мкл	

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

Примечание: в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте 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:

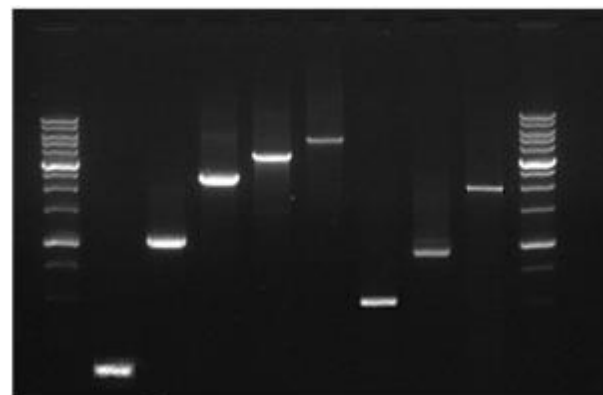
Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5-7 мин	1
Денатурация	95	15 - 30 сек	25 - 40
Отжиг	50 - 68 (Tm-5)	15 - 30 сек	
Элонгация	72	1 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	72	5 - 15 мин	1

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

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения.

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

Результаты амплификации ДНК с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)



Дорожка L - молекулярный маркер ДНК от 250 до 10000 п.о. Дорожки 1-5 - амплификация фрагментов длиной 175, 1000, 2000, 3500 и 5000 п.о. ДНК фага λ, соответственно. Дорожки 6-8 - амплификация фрагментов длиной 500, 900 и 2000 п.о. геномной ДНК человека, соответственно.

Хранение и транспортировка: при -20 °С; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

Рекомендации для предупреждения контаминаций при ПЦР.

Во время ПЦР нарабатывается более 10 миллионов копий ДНК-матрицы. Таким образом, необходимо исключить возможность попадания других матриц и ампликонов, которые могут присутствовать в лаборатории. Ниже представлены общие рекомендации для снижения риска контаминации:

- Подготовку образцов ДНК, приготовление реакционной смеси, амплификацию и анализ ПЦР-продуктов необходимо проводить в разных территориальных зонах.
- Подготавливайте реакционные смеси в ПЦР-шкафах с ламинарным потоком и оснащенных УФ-лампой.
- Используйте новые перчатки при очистке ДНК и приготовлении смесей и растворов.
- Используйте реагенты, предназначенные для ПЦР. Используйте наконечники для дозаторов, снабженные аэрозольным фильтром при подготовке образцов ДНК и приготовлении реакционных смесей.
- Для проверки на отсутствие контаминации готовьте смесь без ДНК матрицы (отрицательный контроль).

Рекомендации для подбора праймеров

Для подбора праймеров используйте хорошо зарекомендовавшие себя программы типа

Primer3 http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi и следуйте основным правилам:

- Длина праймера, в основном, составляет 18 - 22 нуклеотидов.
- Разница в температурах плавления (T_m) двух праймеров не должна превышать 3 °C.
- Оптимальный GC состав праймеров 40 - 60%. В идеале, G и C нуклеотиды должны быть распределены равномерно по всей длине праймера.
- Избегайте формирования на 3'-конце праймера подряд более трех G или C нуклеотидов для снижения риска неспецифического отжига.
- Если возможно, праймер должен заканчиваться на 3' конце G или C нуклеотидом.
- Избегайте праймеров с самокомплементарными участками, комплементации между праймерами и направленными праймер-повторов для предотвращения формирования шпилек и димеров праймеров.
- Убедитесь в отсутствии нежелательных сайтов комплементарности между праймерами и ДНК-матрицей.
- При подборе вырожденных праймеров на 3'-конце должно сохраняться как минимум три консервативных нуклеотида.

Компоненты реакционной смеси

ДНК-матрица

Оптимальное количество ДНК-матрицы для реакционной смеси объемом 50 мкл составляет 0.01 – 1 нг в случае плазмиды и фаговой ДНК и 0.1 – 1 мкг в случае геномной ДНК. Более высокие количества матрицы повышают риск образования неспецифических продуктов амплификации, низкие количества матрицы снижают точность амплификации. Все общепринятые методы очистки ДНК могут применяться для подготовки анализируемого образца. Стоит помнить, что следовые количества определенных агентов, используемых для выделения и очистки ДНК, таких как фенол, ЭДТА и протеиназа К могут ингибировать ДНК полимеразу. Осаждение и неоднократная промывка 70% этанолом обычно приводит к удалению следовых загрязнений из образца ДНК.

Праймеры

Рекомендуемые концентрации праймеров для ПЦР находятся в диапазоне 0.1 - 1 мкМ. Завышенные концентрации праймеров повышают вероятность неспецифического связывания с матрицей и образования альтернативных ПЦР-продуктов. Для праймеров, вырожденных и используемых в ПЦР длинных фрагментов, мы рекомендуем более высокие концентрации в диапазоне 0.3 - 1 мкМ.

Характеристики циклов амплификации

Начальная ДНК денатурация и активация фермента

Очень важно достигнуть полной денатурации ДНК-матрицы в начале ПЦР, что обеспечит её эффективное использование во время первого цикла амплификации. Если GC состав матрицы 50% и менее, достаточно начальной денатурации при 95 °C в течение 1-3 мин.

Денатурация

Стандартным временем денатурации на цикл считается 30 сек. при 95 °C. Для GC-богатых ДНК-матриц этот шаг может быть продлён до 3-4 мин.

Элонгация

Оптимальная эффективность для *Taq* ДНК-полимеразы наблюдается в диапазоне температур 70-75 °C. Скорость синтеза *Taq* ДНК-полимеразы варьирует от 30 до 60 п.о. в секунду в зависимости от сложности матрицы. В случае длинных матриц (более 2 т.п.о.) рекомендуется рассчитывать время элонгации исходя из соотношения 1 мин/т.н.

Количество циклов

Если имеется менее 10 копий ДНК-матрицы на реакцию, то для эффективной амплификации необходимо не менее 40 циклов. Для большего количества матрицы достаточно 25 - 35 циклов.

Финальная элонгация

После последнего цикла рекомендуется инкубировать ПЦР смесь дополнительно 5 -15 мин. при 72 °C для достройки, возможно незавершенных, продуктов реакции. Если ПЦР-продукт будет клонирован в ТА-вектор, финальную элонгацию необходимо продлить до 30 мин. для достижения максимальной эффективности формирования 3'- dA концов у ПЦР-продуктов.

Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность

ДНК была стабильна после инкубации 1 мкг фрагмента ДНК фага лямбда в присутствии 25 мкл **БуоМастер Taq ПЦР-Color (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °C и 70 °C.

Рибонуклеазная активность

Отсутствие рибонуклеазной активности было подтверждено после инкубации 1 мкг 5'-[P^{32}] меченого фрагмента РНК в присутствии 25 мкл **БуоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °C.

Функциональный анализ

БуоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) реакционная смесь была протестирована при амплификации участков разной длины ДНК фага лямбда и геномной ДНК человека.