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
E-mail: sales@biolabmix.ru

БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)

Кат. номер MHC040-100, MHC040-400

Описание

Набор БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) содержит 2× реакционную смесь БиоМастер LR HS-ПЦР-Color, ДМСО и стерильную воду. Реакционная смесь БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) предназначена для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0,2 до 30 т.п.н. с высокой точностью, повышенными специфичностью и продуктивностью. Данная смесь также идеально подходит для амплификации GC-богатых (>65%) и сложных участков ДНК. В состав реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- смесь полимераз (HS-Taq и Pfu);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} (4 мМ),
- краситель.

Смесь БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) содержит комбинацию из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной HS-Taq ДНК-полимеразы и Pfu ДНК-полимеразы с корректирующей активностью. Смесь полимераз неактивна при комнатной температуре (вариант «горячего старта»). Для активации ферментов необходим прогрев реакционной смеси при 95 °C в течение 5 мин.

Сочетание полимераз позволило повысить точность и надежность амплификации в несколько раз по сравнению с HS-Taq ДНК-полимеразой. Совместное использование двух ферментов дает возможность нарабатывать ПЦР-продукты до 30 т.п.н. Продукты, полученные с помощью БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×), преимущественно содержат 3′-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

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. Добавленные красители и повышенная вязкость раствора позволяют наносить реакционную смесь сразу на гель.

Состав набора

Кат. №	БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)	Стерильная вода	ДМСО	Кол-во реакций по 50 мкл
MHC040-100	2 × 1,25 мл	2 × 1,25 мл	1 × 0,2 мл	100
MHC040-400	6 × 1,67 мл	2 × 1,8 мл	1 × 1 мл	400

Состав БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)

100 мМ Трис-HCl, pH 8,9 (при 25 °C), 100 мМ KCl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ $MgSO_4$, 0,1 ед. акт./мкл смеси ферментов, 0,2% Tween 20, стабилизаторы ДНК-полимераз и маркерный краситель.

Область применения

- ПЦР для получения длинных фрагментов ("long-range" ПЦР);
- получение продуктов для TA-клонирования;
- амплификация GC-богатых и сложных матриц.

Свойства смеси полимераз

Смесь ДНК-полимераз специально разработана для эффективной амплификации фрагментов ДНК от 0,2 до 30 т.п.н. с различных матриц. Полученная смесь обладает 5′-3′ ДНК-зависимой полимеразной, 5′-3′ экзонуклеазной и 3′-5′ экзонуклеазной (корректирующей) активностями. Скорость продвижения Taq ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 1-2 т.п.н./мин.

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq и Pfu ДНК-полимераз;
- Эффективность ПЦР сохраняется на протяжении всего срока хранения смеси, а также при многократном замораживании-размораживании;
- Смесь содержит красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения на гель.

Преимущества использования

- амплификация длинных фрагментов:
  до 30 т.п.н. с ДНК вирусов,
  до 15 т.п.н. с геномной ДНК.
- повышенная точность амплификации по сравнению с HS- Taq ДНК-полимеразой;
- фермент с "горячим стартом" повышает специфичность, чувствительность и выход реакции;
- для активации смеси ДНК-полимераз требуется не более 5 мин;
- сокращение времени на подготовку реакции;
- амплификация широкого спектра ДНК-матриц;

- снижение вероятности контаминации при смешивании компонентов ПЦР;
- облегчение стадии нанесения на гель. Благодаря высокой плотности смеси добавления в пробу буфера для нанесения не требуется;
- возможность ТА-клонирования продуктов ПЦР за счет дезоксирибоаденозиновых остатков, выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК.

Протокол выполнения амплификации

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

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)	25 мкл	1×
Прямой праймер	переменный	0,1-800 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-800 нМ
ДНК-матрица	переменный	1-500 нг
Стерильная вода	до 50 мкл	

Примечание: в случае необходимости добавить ДМСО от 1 до 5% от конечного объема реакционной смеси. При этом учитывайте изменение Tm* праймеров при составлении программы.

3. Осторожно перемешать и сбросить капли со стенок пробирки, используя центрифугу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавить в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.
4. При амплификации фрагмента до 10 т.п.н. можно использовать стандартную трехшаговую программу. Для амплификации продуктов более 10 т.п.н. рекомендуем следующие режимы (при выборе программы амплификации, пожалуйста, ознакомьтесь с рекомендациями по её оптимизации).

Трехшаговая программа:

Шаг	Температура, °C	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	x мин **	
Денатурация	94	10-20 сек	15-20
Отжиг	50–68 (Tm-5)*	30 сек	
Элонгация	68	x (+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×(A+T) + 4×(G+C).

** x – время элонгации зависит от длины амплифицируемой последовательности:

Размер ампликона, т.п.н.	3	6	10	15	20	30
Время элонгации, мин	2	4	8	13	16	22

Двухшаговая программа:

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

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофоретическим методом. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения. Для разделения продуктов реакции электрофоретическим методом мы рекомендуем использовать 1× TAE буфер с бромистым этидием.

Подвижность красителей в 0,5–1,5% агарозном геле:

Ксилен цианол	Бромфеноловый синий	Orange G	Тартразин
10000 – 4000 п.н.	500-400 п.н.	<100 п.о	<20 п.н.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °C – 7 дней; при +4 °C – 4 месяца; при -20 °C – 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.