



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

LyоМастер HS-Taq ПЦР (2*)

Кат. номер LMН010-100, LMН010-450

Описание

Набор LyоМастер HS-Taq ПЦР содержит лиофилизированную смесь LyоМастер HS-Taq ПЦР, 50 мМ MgCl₂ и буфер для нанесения (6×). Лيوфилизированная смесь LyоМастер HS-Taq ПЦР предназначена для проведения ПЦР-анализа большого количества образцов. Лيوфилизированная форма удобна в обращении, не требует специального температурного режима для транспортировки и хранения реактива. Для подготовки реагента к использованию достаточно добавить безнуклеазную воду. В состав LyоМастер HS-Taq ПЦР реакционной смеси входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивная рекомбинантная Taq ДНК-полимераза;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg²⁺
- криопротекторы;
- стабилизаторы.

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. Реакционная смесь LyоМастер HS-Taq ПЦР химически стабильна, инертна и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы.

ДНК-полимераза, входящая в состав смеси, неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев ресуспендированной 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.

Состав набора

Кат №	LyоMaster HS- Taq ПЦР	50 мМ MgCl ₂	Буфер для нанесения (6х)	Количество реакций по 40 мкл
LMH010-100	4 × 0,5 мл	1 × 0,5 мл	1 × 0,5 мл	100
LMH010-450	18 × 0,5 мл	1 × 1 мл	1 × 1 мл	450

Состав LyоMaster HS-Taq ПЦР при разведении в 0,5 мл воды

100 мМ Трис-НCl, pH 8,5 (при 25 °C), 100 мМ KCl, 0,4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 0,15 ед. акт./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,2% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, криопротекторы.

Область применения

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

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

Свойства реакционной смеси

- Реакционная смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Реакционная смесь представлена в лиофилизированной форме и не требует особых температурных условий хранения;
- Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения. Хранение **LyоMaster HS-Taq ПЦР** в течение трех месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°C не снижает эффективность ПЦР;
- После ресуспендирования смесь не снижает эффективности после 30 циклов заморозки/разморозки;
- Смесь содержит компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства работы с ней;
- Ресуспендированная реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии “горячий старт” и активируется после инкубации при 95 °C в течение 5 мин;
- Смесь не содержит веществ, мешающих проведению оптического контроля за ходом реакции по изменению флуоресценции пробы.

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).
- Возможно использование в широком спектре видов ПЦР.
- 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.

Протокол выполнения амплификации

Лиофилизированная форма реакционной смеси позволяет более гибко подходить к схеме её использования. Ниже представлено три варианта протоколов использования лиофилизированной смеси **LyоMaster HS-qPCR: базовый, модифицированный и кастомизированный.**

Базовый протокол

Базовый протокол предполагает получение 2× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 500 мкл стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Модифицированный протокол

Модифицированный протокол предполагает получение 4× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 250 мкл стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Кастомизированный протокол

Кастомизированный протокол – это протокол, разработанный пользователем. Данный подход может быть удобен при использовании всего объема пробирки, например, для тестирования с одной парой праймеров или при ином варианте. Пользователь самостоятельно может определять объем и состав растворителя. В случае кастомизированного подхода объем реакции можно варьировать, а кратность смеси зависит от выбранного объема растворителя.

Состав реакционной смеси для проведения амплификации.

1. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 40 мкл (**для базового и модифицированного протоколов**):

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация
LyоMaster HS-Taq ПЦР (2x)/(4x)	20/10	1x
Прямой праймер	переменный	0,1-600 нМ
Обратный праймер		0,1-600 нМ
ДНК-матрица		1 пг-1 мкг
Стерильная вода	До 40 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, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	3-5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	25-50
Отжиг	50-68 (Tm-5)	5-15 сек	
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 проанализировать продукты амплификации электрофорезом. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения.

Примечание: для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1 x 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 °C – до 6 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C – 18 месяцев.

Условия транспортировки

Транспортировка при температуре окружающей среды до 14 суток, при этом, температура не должна превышать +30°C. **Берегите от влаги!**