



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

БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)

Кат. номер МН040-100, МН040-400

Описание

Набор БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) содержит 2× реакционную смесь БиоМастер LR HS-ПЦР (2×), ДМСО, стерильную воду и буфер для нанесения (6×) на гель. Реакционная смесь БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) предназначена для амплификации длинных фрагментов ДНК от 0,2 до 30 т.п.о. 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 (2×) входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- смесь полимераз (HS-Taq и Pfu);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg²⁺.

Смесь БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) содержит комбинацию из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной HS-Taq ДНК-полимераза 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 °С в течение 5 мин.

Сочетание полимераз позволило повысить точность и надежность амплификации в несколько раз по сравнению с Taq ДНК-полимеразой. Совместное использование двух ферментов дает возможность нарабатывать ПЦР-продукты до 30 т.п.о. Продукты, полученные с помощью БиоМастер LR HS-ПЦР (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.

Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)	Вода	ДМСО	Буфер для нанесения (6×)	Кол-во реакций по 50 мкл
МН040-100	2 × 1,25 мл	2 × 1,25 мл	1 × 0,2 мл	1 × 0,5 мл	100
МН040-400	6 × 1,67 мл	2 × 1,8 мл	1 × 1 мл	1 × 1 мл	400

Состав БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)

100 мМ Трис-НСl, рН 8,9 (при 25 °С), 100 мМ КСl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgSO₄, 0,1 ед. акт./мкл смеси ферментов, 0,2% Tween 20, стабилизаторы ДНК-полимераз.

Область применения

- ПЦР для получения длинных фрагментов ("long-range" ПЦР);
- получение продуктов для ТА-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.о. 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.о./мин.

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной работы HS-Taq и Pfu ДНК-полимераз;
- Состав смеси обеспечивает возможность длительного хранения (хранение БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) в течение 7 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР) и многократного замораживания-размораживания (более 50 раз).

Преимущества использования

- амплификация длинных фрагментов:
 - до 30 т.п.о. с ДНК вирусов,
 - до 15 т.п.о. с геномной ДНК.
- повышенная точность амплификации по сравнению с 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;

- 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 (2x)	25	1x
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 T_m праймеров при составлении программы.

3. Осторожно перемешать и сбросить капли со стенок пробирки, используя центрифугу.

Примечание: 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.о. можно использовать стандартную трехшаговую программу. Для амплификации продуктов более 10 т.п.о. рекомендуем следующие режимы (при выборе программы амплификации, пожалуйста, ознакомьтесь с рекомендациями по её оптимизации).

Трехшаговая программа:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	92-94	2-4 мин	1
Денатурация	92-94	10-20 сек	
Отжиг	50-68 (T_m-5)	30 сек	10
Элонгация	68	х мин	
Денатурация	94	10-20 сек	
Отжиг	50-68 (T_m-5)	30 сек	15-20
Элонгация	68	х (+10 сек/цикл) мин.	
Финальная элонгация	68	5-15 мин	1

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

Двухшаговая программа:

Шаг	Температура, °С	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

x – время элонгации зависит от длины амплифицируемой последовательности:

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

5. После проведения ПЦР анализ продуктов амплификации проводится разделением в гель- электрофорезе с последующим окрашиванием.

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 - 7дней; 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.