



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 (2x)	Вода	ДМСО	Буфер для нанесения (6x)	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 (2x):

100 мМ Трис-НСI, рН 8.9 (при 25 °С), 100 мМ КСI, 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 (2x) 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 Tm праймеров при составлении программы.

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. 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, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	92–94	2–4 мин	1
Денатурация	92–94	10–20 сек	
Отжиг	50–68 (Tm–5)	30 сек	10
Элонгация	68	x мин	
Денатурация	94	10–20 сек	
Отжиг	50–68 (Tm–5)	30 сек	15–20
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: $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

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:

Хранение в месте, защищенном от попадания света: в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 месяца; при -20°С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки:

Транспортируется термokonтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.