



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;
- Mg^{2+} .

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 Tm 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 (Tm-5) | 30 сек | 10 |
| Элонгация | 68 | х мин | |
| Денатурация | 94 | 10-20 сек | |
| Отжиг | 50-68 (Tm-5) | 30 сек | 15-20 |
| Элонгация | 68 | х (+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 проанализируйте продукты амплификации электрофоретическим методом. Пробы смешивайте с буфером для нанесения и нанесите 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. |

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °С – 7 дней; 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.