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

Расширенный набор для проведения ПЦР с HS-Taq

Кат. номер KH018-500, KH018-2500

Описание:

Расширенный набор для проведения ПЦР с HS-Taq содержит рекомбинантную HS-Taq ДНК-полимеразу, три реакционных буфера и другие необходимые компоненты для проведения ПЦР, за исключением матрицы ДНК и праймеров. В состав набора входят:

- рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза (5 ед. акт./мкл);
- 10× ПЦР буфер;
- 5× Green буфер;
- 5× GC буфер;
- 50 мМ $MgCl_2$ (в отдельной пробирке);
- 50× смесь dNTP;
- буфер для нанесения (6×).

HS-Taq ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную Taq ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. HS-Taq ДНК-полимераза неактивна при температуре до 70°C. Это позволяет избежать образования неспецифических продуктов и праймер-димеров при низкой температуре на стадии замешивания ПЦР. Активация осуществляется на первом цикле при короткой 5-и минутной инкубации при 95°C. Рекомбинантная 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.

10× ПЦР буфер оптимизирован для проведения большинства видов ПЦР, в том числе, для проведения ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующими красителями или флуоресцентными зондами. Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы.

5× Green буфер содержит маркерные красители (сине-зелёный и желтый) и добавки, увеличивающие плотность раствора, для удобного нанесения на гель. Предназначен для стандартной ПЦР с оценкой выхода продуктов по конечной точке (методом разделения продуктов в геле). Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы.

5× GC буфер разработан для амплификации участков ДНК богатых GC и/или имеющих сложную пространственную структуру. Буфер химически стабилен, содержит вещества, меняющие температуру отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

В состав буферов входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность Taq ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. Все буферы в условиях разбавления до 1× (однократного) содержат 1,5 мМ $MgCl_2$.

Входящие в набор 50 мМ раствор $MgCl_2$ и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему матрица-праймеры.

Состав набора:

Компонент	Каталожный номер (количество)	
	K018-500 (500 ед. акт.)	K018-2500 (2500 ед. акт.)
HS-Taq DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл*	1 × 100 мкл	2 × 250 мкл
10× ПЦР буфер	1 × 1,5 мл	3 × 1,8 мл
5× Green буфер	2 × 1,5 мл	5 × 1,8 мл
5× GC буфер	2 × 1,5 мл	5 × 1,8 мл
50 мМ $MgCl_2$	1 × 1 мл	2 × 1 мл
50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	2 × 200 мкл	2 × 800 мкл
Буфер для нанесения (6×)	1 × 1 мл	1 × 1,8 мл

* За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее включение 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимый продукт за 30 мин при 74°C. Условия реакции: 50 мМ Трис-HCl, pH 9.0 (при 25°C), 50 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [^{3}H] dTTP, 0,25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

Буфер хранения:
50 мМ Трис-HCl, pH 8.0 (при 25°C), 50 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 1мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 1% (v/v) Тритон X-100.

10× PCR buffer:
100 мМ Трис-HCl, pH 8.5 (при 25°C), 500 мМ KCl, 15 мМ $MgCl_2$, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы.

5× Green буфер:
50 мМ Трис-HCl, pH 8.5 (при 25°C), 250 мМ KCl, 7,5 мМ $MgCl_2$, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы, маркерные красители.

5× GC буфер:
100 мМ Трис-HCl, pH 8.5 (при 25°C), 250 мМ KCl, 7.5 мМ $MgCl_2$, 0.5% (v/v) Tween 20, ДМСО, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы.

Область применения:

- ПЦР с “горячим” стартом
- Высокопроизводительная ПЦР
- Обычная ПЦР с высокой воспроизводимостью
- Наработка ПЦР-продуктов для ТА клонирования
- Вторая стадия ОТ-ПЦР
- ПЦР GC-богатых и сложно-структурированных участков ДНК

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 т.п.о.

Ингибирование и инактивация

Ингибиторы: ионные детергенты (дезоксихолат натрия, саркозил и додецилсульфат натрия (SDS) в концентрациях выше, чем 0.06, 0.02 и 0.01%, соответственно).
Инактивируется экстракцией смесью фенол/хлороформ.

Протокол выполнения амплификации

Приготовьте несколько параллельных реакций и минимизируйте возможную ошибку пипетирования. Приготовьте реакционную смесь ПЦР, смешав воду, буфер, смесь dNTP, праймеры и HS-Taq ДНК-полимеразу. Реакционную смесь необходимо приготовить в расчёте на нужное количество реакций плюс одна. Перенесите аликвоты реакционной смеси ПЦР в индивидуальные пробирки и затем добавьте ДНК матрицу.

1. Разморозить реакционную смесь и осторожно перемешать.
   Примечание: в случае образования осадка в буфере, нагреть пробирку до 50°C и перемешать до полного его растворения.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
10 (5)× ПЦР буфер	5 (10) мкл	1×
50× смесь dNTP	1 мкл	0.2 мМ каждого
Прямой праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
HS-Taq DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл	переменный	1-5 ед.акт.
Стерильная вода	до 50 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, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	25-50
Отжиг	50-68 (Tm-5)	10-20 сек	
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	72	5-15 мин	1

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

Примечание: в случае использования 5× GC буфера, возможно, потребуется снизить Tm на 2-5°C из-за присутствия веществ, влияющих на образование комплекса праймер/матрица.

5. Метод анализа результатов ПЦР зависит от типа реакции (в режиме реального времени или по конечной точке). При использовании 5× Green буфер анализ проводится с помощью электрофореза в геле без дополнительной пробоподготовки.
   Примечание: для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1xTAE буфер с бромистым этидием.

Условия хранения:

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25°C – 7дней; при +4°C – 4 месяца; при -20°C – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки:

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.