

Информация о продукте

БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x)

Описание продукта

Набор **БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x)** содержит 2x реакционную смесь **БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x)**, ДМСО и стерильную воду. Реакционная смесь **БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x)** 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-Color (2x)** 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-Color (2x)** содержит комбинацию из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной *HS-Taq* ДНК-полимеразы 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-Color (2x)**, преимущественно содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

Буфер, оптимизированный для эффективной работы обеих полимераз, обеспечивает высокий выход продукта. Повышенная вязкость и маркерные красители в составе буфера позволяют наносить реакционную смесь сразу на гель без предварительной подготовки.

Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования. Красители, входящие в состав реакционной смеси, не мешают при очистке ампликона большинством используемых методов.

Состав набора

| Кат. # | БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) | Вода | ДМСО | Кол-во реакций по 50 мкл |
|------------|--------------------------------|-------------|----------|--------------------------|
| МНС040-100 | 2 × 1.25 мл | 2 × 1.25 мл | 1 × 1 мл | 100 |
| МНС040-400 | 6 × 1.67 мл | 3 × 1,8 мл | 1 × 1 мл | 400 |

Состав БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x):

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 и маркерные красители.

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-Color (2x)** в течение 7 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР) и многократного замораживания-размораживания (более 50 раз);
- Смесь содержит красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства нанесения 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. |

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.
- Амплификация широкого спектра ДНК- матриц.
- Упрощение стадии нанесения образцов на гель (благодаря высокой плотности смеси добавления в пробу буфера для нанесения не требуется).
- Возможность ТА клонирования продуктов ПЦР за счет дезоксирибоаденозиновых остатков, выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозить реакционную смесь, осторожно и тщательно перемешать.
2. Взять тонкостенные пробирки для ПЦР и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

| Компонент | Объем | Конечная концентрация |
|---------------------------------------|------------|-----------------------|
| БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (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 добавьте 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, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Предварительная денатурация | 92-94 | 2-4 мин | 1 |
| Денатурация | 92-94 | 10-20 сек | 10 |
| Отжиг | 50 – 68 (Tm-5) | 30 сек | |
| Элонгация | 68 | х мин. | |
| Денатурация | 94 | 10-20 сек | 15-20 |
| Отжиг | 50 – 68 (Tm-5) | 30 сек | |
| 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 (°C) = 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 | х мин. | |
| Денатурация | 94 | 10-20 сек | 15-20 |
| Отжиг/ Элонгация | 68 | х (+10 сек/цикл) мин. | |
| Финальная элонгация | 68 | 5 – 15 мин | 1 |

х – 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 |

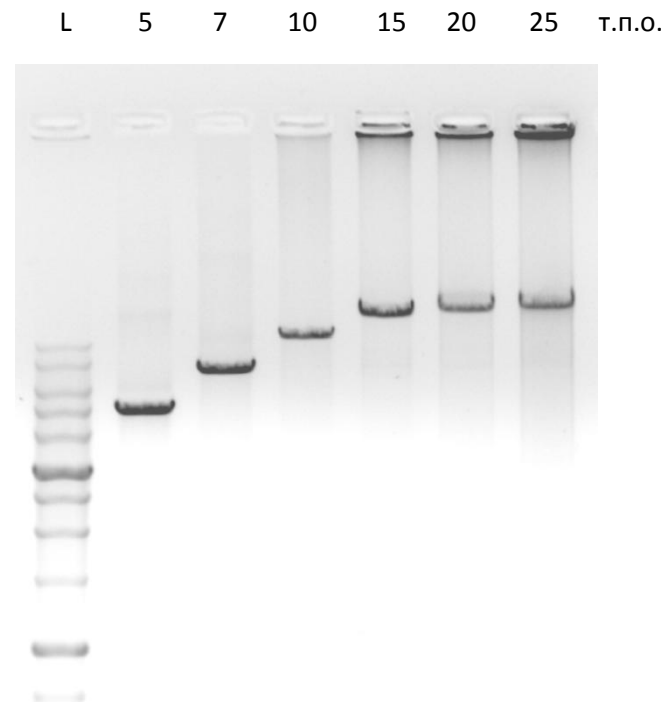
5. После проведения ПЦР проанализировать продукты амплификации гелем электрофорезом.

Примечание: для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1xTAE буфер с бромистым этидием.

Хранение и транспортировка: при -20°C; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

Результаты амплификации ДНК с использованием БюМастер LR ПЦР-Color (2x)



Дорожка L – молекулярный маркер ДНК от 250 до 10000 п.о. Амплификация фрагментов ДНК фага λ разной длины. реакционная смесь объемом 50 мкл. В реакции использовали 10-20 нг ДНК-матрицы. На гель наносили 3 – 4 мкл – фрагменты 5 – 15 т.п.о., 10 мкл – фрагменты 20 и 25 т.п.о.

Рекомендации для предупреждения контаминаций при ПЦР.

Во время ПЦР нарабатывается более 10 миллионов копий ДНК-матрицы. Таким образом, необходимо исключить возможность попадания других матриц и ампликонов, которые могут присутствовать в лаборатории. Ниже представлены общие рекомендации для снижения риска контаминации:

- Подготовку образцов ДНК, приготовление реакционной смеси, амплификацию и анализ ПЦР-продуктов необходимо проводить в разных территориальных зонах.
- Подготавливайте реакционные смеси в ПЦР-шкафах с ламинарным потоком и оснащенных УФ-лампой.
- Используйте новые перчатки при очистке ДНК и приготовлении смесей и растворов.
- Используйте реагенты, предназначенные для ПЦР. Используйте наконечники для дозаторов, снабженные аэрозольным фильтром при подготовке образцов ДНК и приготовлении реакционных смесей.
- Для проверки на отсутствие контаминации готовьте смесь без ДНК матрицы (отрицательный контроль).

Рекомендации для подбора праймеров

Для подбора праймеров используйте хорошо зарекомендовавшие себя программы типа Primer3 http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi и следуйте основным правилам:

- Для получения лучшего результата при амплификации длинных фрагментов длина праймера должна составлять 25 – 32 нуклеотида с температурой отжига выше 65 °С.
- Для амплификации длинных фрагментов рекомендуется использовать праймеры в концентрации 400 нМ.
- Разница в температурах плавления (Tm) двух праймеров не должна превышать 3 °С.
- Оптимальный GC состав праймеров 40 - 60%. В идеале, G и C нуклеотиды должны быть распределены равномерно по всей длине праймера.
- Избегайте формирования на 3'-конце праймера формирования подряд более трех G или C нуклеотидов для снижения риска неспецифического отжига.
- Если возможно, праймер должен заканчиваться на 3' конце G или C нуклеотидом.
- Избегайте праймеров с самокомплементарными участками, комплементации между праймерами и направленных праймер повторов для предотвращения формирования шпилек и димеров праймеров.
- Убедитесь в отсутствии нежелательных сайтов комплементарности между праймерами и ДНК-матрицей.
- При подборе вырожденных праймеров на 3'-конце должно сохраняться как минимум три консервативных нуклеотида.

Компоненты реакционной смеси

ДНК-матрица

Проведение эффективной и качественной амплификации длинных фрагментов в значительной степени зависит от качества ДНК-матрицы. Желательно перед использованием проверить целостность используемой ДНК и использовать методы

выделения и очистки, снижающие формирование одноцепочечных разрывов и её апуринизацию. Оптимальное количество ДНК-матрицы для реакционной смеси объемом 50 мкл составляет 1 – 20 нг в случае плазмиды и фаговой ДНК и 10 –500 нг в случае геномной ДНК. Более высокие количества матрицы повышают риск образования неспецифических продуктов амплификации, низкие количества матрицы снижают точность амплификации. Стоит помнить, что следовые количества определенных агентов, используемых для выделения и очистки ДНК, таких как фенол, ЭДТА и протеиназа К могут ингибировать ДНК полимеразу. Осаждение этанолом и неоднократная промывка 70% этанолом обычно приводит к удалению следовых загрязнений из образца ДНК.

Праймеры

Рекомендуемые концентрации праймеров для ПЦР находятся в диапазоне 0.1 – 1 мкМ. Завышенные концентрации праймеров повышают вероятность неспецифического связывания с матрицей и образования альтернативных ПЦР-продуктов. Для праймеров вырожденных и используемых в ПЦР длинных фрагментов мы рекомендуем более высокие концентрации в диапазоне 0.3 – 1 мкМ.

Характеристики циклов амплификации

Начальная ДНК денатурация и активация фермента

Стремитесь использовать наименьшие температуру и время для начальной денатурации матрицы при амплификации длинных фрагментов. Для амплификации выше 15 т.п.о используйте температуру 92 °С в течении 2-4 мин.

Денатурация

Рекомендуем проводить денатурацию не более 30 сек при 92-94 °С.

Отжиг праймеров

Считается что для отжига праймеров на матрице при высокой температуре достаточно менее одной минуты. Температура отжига праймеров должна быть на 5 °С ниже их температуры плавления (Tm) рассчитанной по методу ближайших соседей. Для ПЦР протяженных фрагментов обычно используются праймеры с Tm выше 65 °С. В таких случаях хороший результат можно получить, объединив стадии отжига и элонгации при 68 °С.

Элонгация

Элонгация для стандартной ПЦР обычно проходит при 72 °С, а при ПЦР протяженных фрагментов проводят при 68 °С. Амплификация коротких фрагментов <10 т.п.о может проводиться при постоянном времени элонгации (40 сек/т.п.о.) для фрагментов >10 т.п.о. первые 10 циклов проводят при постоянном времени, а последующие 15-20 с увеличением времени 10 сек./цикл.

Финальная элонгация

После последнего цикла рекомендуется инкубировать ПЦР смесь дополнительно 5 -15 мин при 68 °С для достройки, возможно незавершенных, продуктов реакции. Если ПЦР-продукт будет клонирован в ТА-вектор, финальную элонгацию необходимо продлить до 30 мин для достижения максимальной эффективности формирования 3'-dA концов у ПЦР-продуктов.



Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность

ДНК была стабильна после инкубации 1 мкг фрагмента ДНК фага лямбда в присутствии 25 мкл **БиоМастер LR ПЦР-Color (2*)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч при 37 °С и 70 °С.

Рибонуклеазная активность

Отсутствие рибонуклеазной активности было подтверждено после инкубации 1 мкг 5'-[P³²] меченого фрагмента РНК в присутствии 25 мкл **БиоМастер LR ПЦР-Color (2*)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч при 37 °С.

Функциональный анализ

БиоМастер LR ПЦР-Color (2*) реакционная смесь была протестирована при амплификации участков разной длины ДНК фага лямбда и геномной ДНК человека.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Т/ф (383) 363-51-91
<http://www.biolabmix.ru>