

Информация о продукте

Набор для проведения ПЦР с *HS-Taq* (+MgCl₂)

Описание продукта

Набор для проведения ПЦР с *HS-Taq* (+MgCl₂) содержит рекомбинантную *HS-Taq* ДНК-полимеразу и растворы всех необходимых компонентов для проведения стандартной ПЦР с “горячим” стартом, за исключением матрицы ДНК и праймеров. В состав набора входят: раствор *HS-Taq* ДНК-полимеразы (5 ед. акт./мкл), 5× ПЦР буфер (+MgCl₂), 50 мМ MgCl₂, 50× смесь dNTP и 6×буфер для нанесения на гель. Все реагенты высокого качества и оптимизированы для проведения ПЦР.

HS-Taq ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную *Taq* ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. *HS-Taq* ДНК-полимераза не активна при температуре до 70 °С. 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 °С. 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.

5× ПЦР буфер (+MgCl₂) оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР. В состав буфера входят **MgCl₂ (7,5 мМ)** и добавки, повышающие время полужизни и процессивность *HS-Taq* ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. Буфер химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристики плавления матрицы. Входящие в набор 50 мМ раствор MgCl₂ и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакцию смесь под конкретную систему матрица-праймеры, а 6×буфер для нанесения на гель облегчает пробоподготовку для анализа в геле и контроль над ходом электрофореза.

Состав набора

Кат. #	<i>HS-Taq</i> DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл*	5× ПЦР буфер (+MgCl ₂)	50 мМ MgCl ₂	50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	Буфер для нанесения (6×)	Кол-во, Ед. Акт.
КН016-500	1 × 100 мкл	2 × 1,5 мл	1 × 1 мл	2 × 200 мкл	1 × 1,5 мл	500
КН016-2250	3 × 150 мкл	8 × 1,5 мл	2 × 1 мл	4 × 400 мкл	3 × 1,5 мл	2250

* За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее включение 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимый продукт за 30 мин при 74 °С. Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl, pH 9.0 (при 25 °С), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [³H] dTTP, 0,25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

Буфер хранения:

50 мМ Трис-НСl, pH 8.0 (при 25 °С), 50 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 1мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 1% (v/v) Тритон X-100.

5× ПЦР буфер (+MgCl₂):

50 мМ Трис-НСl, pH 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 7,5 мМ MgCl₂, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы *HS-Taq* ДНК-полимеразы.

Область применения:

- ПЦР с “горячим” стартом
- Высокопроизводительная ПЦР
- Обычная ПЦР с высокой воспроизводимостью
- Нарботка ПЦР-продуктов для ТА клонирования
- ОТ-ПЦР

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 реакцию смесь ПЦР смешав воду, буфер, смесь dNTP, праймеры и *HS-Taq* ДНК-полимеразу. Приготовьте реакцию смесь в расчёте на количество реакций плюс одна. Аликвотируйте реакцию смесь ПЦР в индивидуальные ПЦР пробирки и затем добавьте ДНК матрицу.

1. Разморозьте реакцию смесь и осторожно перемешайте.
2. В пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
5× ПЦР буфер (+MgCl ₂)	10 мкл	1×
50× смесь dNTP	1 мкл	0.2 мМ каждого
50 мМ MgCl ₂ *	переменный	2-5 мМ
Прямой праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
<i>HS-Taq</i> DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл	переменный	1-5 ед. акт.
Стерильная вода	до 50 мкл	

*буфер 5× ПЦР буфер (+MgCl₂) уже содержит 7,5 мМ MgCl₂ (конечная концентрация 1,5 мМ)

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

Примечание: в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

Примечание: Готовую реакцию смесь следует быстро переместить в предварительно прогретый до 95 °С амплификатор.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Кол
Предварительная денатурация	95	5 мин	
Денатурация	95	5 – 10 сек	
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	10 - 20 сек	
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	72	5 – 15 мин	

Tm - температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой:

$$Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с буфером для нанесения и наносятся на гель.

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

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.

Хранение: в месте, защищенном от попадания света: при +25 °С – 7дней; при +4 °С – 6 месяцев; при -20°С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Транспортировка: при 0 - +4 °С, допускается транспортировка при комнатной температуре до 3-х дней.

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