

**1957.0500 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, 500 ед полимеразы, Диаэм**

**1957.2250 Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, 2500 ед полимеразы, Диаэм**

### *Описание продукта*

**Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой Hot Start** 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, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 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 неактивна при температуре до +70 °С. Это позволяет избежать образования неспецифических продуктов и праймер-димеров при низкой температуре на стадии смешивания компонентов ПЦР-смеси. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР путём 5-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 1 т.п.н./мин. Рекомбинантная **HS-*Taq*** ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.н. и обладает способностью присоединять адениновый остаток к 3'-концу синтезируемой цепи ДНК, поэтому ПЦР-фрагменты пригодны для ТА-клонирования.

**5× ПЦР-буфер** оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР (**не содержит MgCl<sub>2</sub>**). В состав буфера входят 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 MgCl<sub>2</sub> и 50× смесь dNTP позволяют легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему «матрица-праймеры», а **6× Буфер для нанесения на гель** облегчает пробоподготовку для электрофореза ПЦР-продуктов и контроль над ходом электрофореза.

## Состав набора

Кат. #	HS-Taq ДНК-полимераза, 5 ед. акт./мкл*	5× ПЦР-буфер	50 мМ MgCl <sub>2</sub>	50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	6× буфер для нанесения на гель	Кол-во, ед. акт.
1957.0500	1 × 100 мкл	2 × 1,5 мл	1 × 1 мл	2 × 200 мкл	1 × 1,75 мл	500
1957.2250	3 × 150 мкл	8 × 1,5 мл	2 × 1 мл	4 × 400 мкл	3 × 1.75 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, рН 9.0 (при 25 °С), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ dATP, 200 мМ dCTP, 200 мМ dGTP, 50 мМ [<sup>3</sup>H] dTTP, 0.25 мг/мл активированной ДНК из тимуса теленка.

### Буфер для хранения HS-Taq ДНК-полимеразы:

50 мМ Трис-НСl, рН 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:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы.

### Область применения:

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

### Ограничения к использованию

- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 т.п.н.

### 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.

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

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

### **Протокол выполнения амплификации**

1. Разморозьте компоненты набора и тщательно перемешайте на вортексе (кроме **HS-Taq** ДНК-полимеразы).

*Примечание:* в случае формирования осадка в буфере нагрейте пробирку до 50 °С и перемешайте до полного его растворения.

2. Приготовьте реакционную смесь для ПЦР из расчёта «количество реакций + одна», смешав воду, буфер, смесь dNTP, MgCl<sub>2</sub>, праймеры и **HS-Taq** ДНК-полимеразу.

#### **Объёмы компонентов ПЦР-смеси для 1 реакции объёмом 50 мкл**

<b>Компонент</b>	<b>Объем</b>	<b>Конечная концентрация</b>
<b>5× ПЦР буфер</b>	10 мкл	1×
<b>50× смесь dNTP</b>	1 мкл	0.2 мМ каждого
<b>50 мМ MgCl<sub>2</sub></b>	переменный	1-5 мМ
<b>Прямой праймер</b>	переменный	0,1 – 300 нМ
<b>Обратный праймер</b>	переменный	0,1 – 300 нМ
<b>ДНК-матрица</b>	переменный	10 пг – 1 мкг
<b>HS-Taq DNA полимеразы, 5 ед. акт./мкл</b>	переменный	1.25 ед. акт.*
<b>Стерильная вода</b>	до 50 мкл	

\* Для ампликонов длиной более 3 тыс. п.н. рекомендуется добавлять 2.5-5 ед. полимеразы на 50 мкл реакционной смеси

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

4. Аликвотируйте реакционную смесь в индивидуальные ПЦР-пробирки и затем добавьте ДНК-матрицу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

5. Поместите пробирки с реакционной смесью в амплификатор и проведите ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

<b>Шаг</b>	<b>Температура, °С</b>	<b>Время инкубации</b>	<b>Количество циклов</b>
<b>Предварительная денатурация</b>	95	5 мин	1
<b>Денатурация</b>	95	15 – 30 сек	

<b>Отжиг</b>	50 – 68 (Tm-5)	15 - 30 сек	25 - 40
<b>Элонгация</b>	72	1 мин/т.п.н.	
<b>Финальная элонгация</b>	72	5 – 15 мин	1

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

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

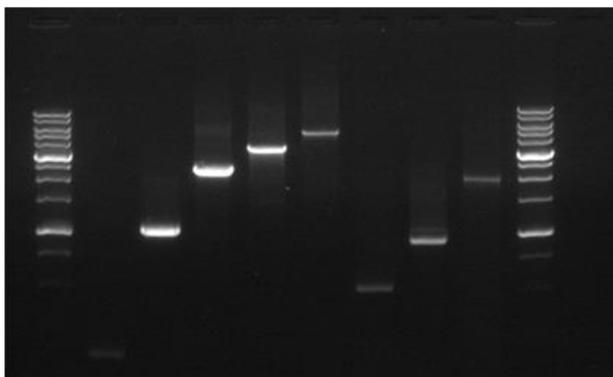
6. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с **Буфером для нанесения** и наносятся на гель. Для анализа продуктов реакции рекомендуется электрофорез в агарозном геле с TAE-буфером.

#### Подвижность красителей в 0.5 – 1.5% агарозном геле

<b>Ксилен цианол</b>	<b>Бромфеноловый синий</b>	<b>Orange G</b>	<b>Тартразин</b>
10000-4000 п.о.	500-400 п.о.	<100 п.о.	<20 п.о.

#### Результаты амплификации ДНК с использованием набора для проведения ПЦР с HS-Taq

L 1 2 3 4 5 6 7 8 L



Дорожка L – маркер ДНК от 250 до 10000 п.н. Дорожки 1-5 – амплификация фрагментов ДНК фага  $\lambda$  длиной 175, 1000, 2000, 3500 и 5000 п.н., соответственно. Дорожки 6-8 – амплификация фрагментов геномной ДНК человека длиной 500, 900 и 2000 п.н., соответственно.