

1960.0200 Экстра-микс для ПЦР HS-Taq, 200 реакций, Диаэм

1960.1020 Экстра-микс для ПЦР HS-Taq, 1020 реакций, Диаэм

Описание продукта

Экстра-микс HS-Taq представляет собой 2-кратную реакционную смесь, содержащую все компоненты, необходимые для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- высокопроцессивную рекомбинантную **HS-Taq** ДНК-полимеразу с «горячим» стартом,
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов,
- ПЦР-буфер,
- Mg^{2+} .

Экстра-микс оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с «горячим» стартом; он химически стабилен, инертен и не меняет оптимальной температуры отжига праймеров или характеристик плавления матрицы. В его состав входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность **HS-Taq** ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР, и компоненты, увеличивающие плотность пробы для удобства работы с ней.

Форма реагентов для проведения ПЦР в виде **экстра-микса** экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Экстра-микс HS-Taq не содержит веществ, мешающих проведению оптического контроля за ходом реакции по изменению флюоресценции пробы.

HS-Taq ДНК-полимераза, входящая в состав экстра-микса, неактивна при температуре ниже +70°C. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при +95°C в течение 5 мин. Рекомбинантная **HS-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.; она обладает способностью присоединять адениновый остаток к 3'-концу синтезируемой цепи, поэтому продукты ПЦР могут использоваться для ТА-клонирования.

Кроме **экстра-микса**, в состав набора также включены 50 мМ $MgCl_2$ и стерильная вода. Входящий в набор раствор $MgCl_2$ позволяет легко оптимизировать реакционную смесь под конкретную систему «матрица-праймеры».

Состав набора

Кат. №	Кол-во реакций по 50 мкл	HS-Taq (2x)	50 мМ $MgCl_2$	Вода	6× буфер для нанесения на гель
1960.0200	200	4 x 1.25 мл	1 x 1 мл	4 x 1.25 мл	1 x 1 мл
1960.1020	1020	17 x 1.5 мл	2 x 1.8 мл		1 x 1.8 мл

Состав экстра-микса HS-Taq (2x):

- 100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С)
- 100 мМ КСl
- 0.4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата
- 4 мМ $MgCl_2$
- 0.06 ед. акт./мкл **HS-Taq** ДНК-полимеразы
- 0.2% Tween 20
- стабилизаторы **HS-Taq** ДНК-полимеразы

Преимущества использования экстра-микса с Taq-полимеразой с «горячим» стартом

- Фермент с “горячим” стартом повышает специфичность, чувствительность и выход реакции.
- Для активации HS-Taq ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин.
- Сокращается время на подготовку реакции.
- Снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов ПЦР.
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах).
- Возможно использование в широком спектре видов ПЦР.
- Возможность ТА клонирования продуктов ПЦР за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков.

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.

Срок хранения и транспортировка: 1 год при -20 °С; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозьте реакционную смесь, тщательно перемешайте. Не рекомендуется перемешивать на Вортексе.

2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
экстра-микс HS-Taq (2x)	25 мкл	1x
Прямой праймер	переменный	0.1 – 0.3 мкМ
Обратный праймер	переменный	0.1 – 0.3 мкМ
ДНК-матрица	переменный	10 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 50 мкл	

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15-30 сек	25-40
Отжиг	50 - 68 (Tm*-5°C)	15-30 сек	

Элонгация	72	1 мин/тыс. п.н.	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

*Tm - температура плавления дуплекса «матрица/праймер», определяется структурой праймеров. Для

L 1 2 3 4 5 6 7 8
↑

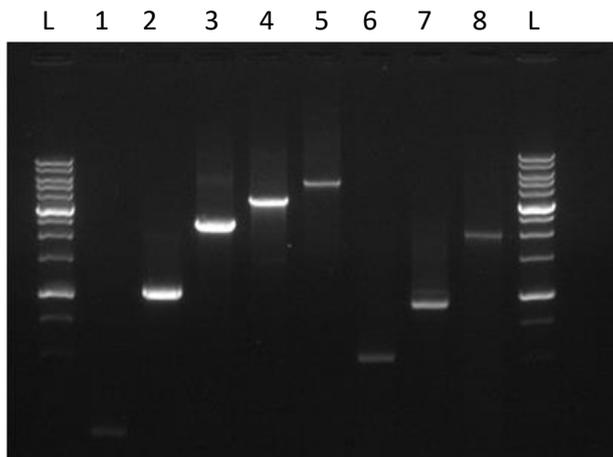
приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой:
 $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы можно наносить на гель без добавления утяжеляющего буфера. Для анализа продуктов реакции электрофорезом рекомендуется электрофорез в 1xTAE буфере.

Подвижность красителей в 0.5 – 1.5% агарозном геле

Ксилен цианол	Бромфеноловый синий	Orange G	Тартразин
4000-10000 п.н.	400-500 п.н.	< 100 п.н.	<20 п.н.

Результаты амплификации ДНК с использованием экстра-микса HS-Taq



Дорожка L – маркер ДНК от 250 до 10000 п.н. Дорожки 1-5 – амплификация фрагментов ДНК фага λ 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.

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 рекомендуется параллельно ставить ПЦР без ДНК-матрицы (отрицательный контроль).

В случае загрязнения рабочих поверхностей или нагревательных элементов амплификаторов нуклеиновыми кислотами, олигонуклеотидами или ПЦР-продуктами рекомендуется деконтаминация с помощью специальных реагентов, осуществляющих неферментативную диграцию нуклеиновых кислот, например, [DNA-ExitusPlus](#). Этот реагент также рекомендуется использовать для регулярной обработки поверхности столов, ПЦР-боксов, электрофорезного оборудования и др.

Рекомендации для подбора праймеров.

Для подбора праймеров используйте хорошо зарекомендовавшие себя программы типа **Primer-BLAST** и следуйте основным правилам при подборе праймеров для ПЦР:

- длина праймера, в основном, составляет 18 – 22 нуклеотидов.
- разница в температурах плавления (T_m) 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 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.
- проверьте возможность присутствия 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 для ПЦР

ДНК-матрица. Оптимальное количество ДНК-матрицы для реакционной смеси объемом 50 мкл составляет 0,01 – 1 нг в случае плазмиды и фаговой ДНК и 0,1 – 1 мкг в случае геномной ДНК. Более высокие количества матрицы повышают риск образования неспецифических продуктов амплификации, низкие количества матрицы снижают точность амплификации. Все общепринятые методы очистки ДНК могут применяться для подготовки анализируемого образца. 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 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 – 0,6 мМ. Завышенные концентрации праймеров повышают вероятность неспецифического связывания с матрицей и образования альтернативных ПЦР-продуктов. Для праймеров, вырожденных и используемых в ПЦР длинных фрагментов, рекомендуются более высокие концентрации в диапазоне 0.3 – 1 мМ.

Характеристики циклов амплификации

Начальная ДНК денатурация и активация фермента. Очень важно достигнуть полной денатурации ДНК-матрицы в начале ПЦР, что обеспечит её эффективное использование во время первого цикла амплификации. Если GC-состав матрицы 50% и менее, достаточно начальной денатурации при +95 °С, в течение 1-3 мин.

Денатурация. Стандартным временем денатурации на цикл считается 30 сек. при +95 °С. Для GC-богатых ДНК-матриц этот шаг может быть продлён до 3-4 мин.

Отжиг праймеров. Температура отжига праймеров должна быть на 5 °С ниже их температуры плавления (T_m). Общепринятое время отжига составляет 30 сек. Если наблюдается накопление неспецифических ПЦР-продуктов, температура отжига должна быть оптимизирована пошаговым повышением на 1-2 °С.

Элонгация. Оптимальная эффективность для Taq ДНК-полимеразы наблюдается в диапазоне температур +70-75 °С. Скорость синтеза Taq ДНК-полимеразы варьирует от 30 до 60 п.н. в секунду в зависимости от сложности матрицы. В случае длинных матриц (более 2 т.п.н.) рекомендуется рассчитывать время элонгации исходя из соотношения 1 мин/тыс.н.

Количество циклов. В большинстве случаев достаточно 25 - 35 циклов для эффективной амплификации. Если имеется менее 10 копий ДНК-матрицы на реакцию, то для эффективной амплификации необходимо не менее 40 циклов. При этом следует помнить, что время полужизни стандартной Taq ДНК-полимеразы при +95°C составляет менее 1 часа, поэтому надо учитывать суммарное время денатурации в ходе ПЦР.

Финальная элонгация. После последнего цикла рекомендуется инкубировать ПЦР-смесь дополнительно 5 -15 мин. при +72 °С для достройки незавершенных продуктов реакции. Если ПЦР-продукт будет клонирован в TA-вектор, финальную элонгацию необходимо продлить до 30 мин. для достижения максимальной эффективности формирования 3'-dA концов у ПЦР-продуктов.

Экзодеоксирибонуклеазная активность. ДНК была стабильна после инкубации 1 мкг фрагмента ДНК фага лямбда в присутствии 25 мкл **HS-Taq ПЦР (2x)** 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 **HS-Taq ПЦР (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при +37 °С.