

**1958.0500** Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, ПЦР-буфер с 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 500 ед полимеразы, Диаэм

**1958.2250** Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start, ПЦР-буфер с 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2250 ед полимеразы, Диаэм

### *Описание продукта*

**Набор реактивов для ПЦР с *Taq*-полимеразой Hot Start (+MgCl<sub>2</sub>)** содержит рекомбинантную **HS-Taq** ДНК-полимеразу и растворы всех необходимых компонентов для проведения стандартной ПЦР с “горячим” стартом (за исключением матрицы ДНК и праймеров). ПЦР-буфер, входящий в состав набора, уже содержит MgCl<sub>2</sub> в концентрации 10 мМ, достаточной для постановки большинства рутинных 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 смешивания компонентов ПЦР-смеси. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР путём инкубации в течение 5 мин 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. **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.

**5× ПЦР-буфер (+MgCl<sub>2</sub>)** оптимизирован для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР. В состав буфера входят MgCl<sub>2</sub> (10 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 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. #	<i>HS-Taq</i> DNA-полимераза, 5 ед. акт./мкл*	5× ПЦР буфер (+MgCl <sub>2</sub> )	50 мМ MgCl <sub>2</sub>	50× смесь dNTP (10 мМ каждого)	6×буфер для нанесения на гель	Кол-во, ед. акт.
1958.0500	1 × 100 мкл	2 × 1.5 мл	1 × 1 мл	2 × 200 мкл	1 × 1.5 мл	500
1958.2250	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, 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 (+MgCl<sub>2</sub>):**

50 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 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 тыс. 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 ПЦР-смеси и тщательно перемешайте на вортексе (кроме **HS-Taq** ДНК-полимеразы). 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, праймеры и **HS-Taq** ДНК-полимеразу.

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

Компонент	Объем	Конечная концентрация
<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	0.1-0.5 мкМ
<b>Обратный праймер</b>	переменный	0.1-0.5-мкМ
<b>ДНК-матрица</b>	переменный	10 пг – 1 мкг
<b>HS-Taq DNA полимеразы, 5 ед. акт./мкл</b>	0.25 мкл	1.25 ед. акт./проба**
<b>Стерильная вода</b>	до 50 мкл	

\*буфер 5× ПЦР буфер (+MgCl<sub>2</sub>) уже содержит 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (конечная концентрация 2 мМ)

\*\* 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:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
<b>Предварительная денатурация и активация HS-Taq ДНК-полимеразы</b>	95	5 мин	1

Денатурация	95	15 – 30 сек	
Отжиг	50 – 68 (T <sub>m</sub> - 5°C)*	15 - 30 сек	25 - 40
Элонгация	72	1 мин/тыс.п.н.	
Финальная элонгация	72	5 – 15 мин	1

\*T<sub>m</sub> - температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета T<sub>m</sub> можно воспользоваться формулой:

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

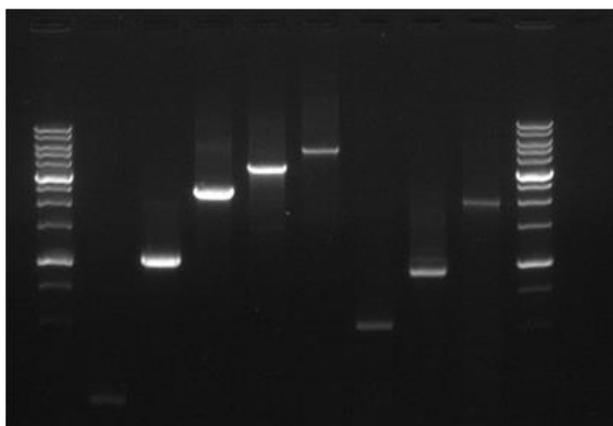
6. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы смешиваются с **Буфером для нанесения** и наносятся на гель. Для анализа продуктов реакции рекомендуется электрофорез в агарозном геле с ТАЕ-буфером.

#### Подвижность красителей в 0,5 – 1,5% агарозном геле

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

#### Результаты амплификации ДНК с использованием Набора для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl<sub>2</sub>)

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 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.