

Информация о продукте

**2,5X Mas<sup>UST</sup>MIX GreenN -1525**Для исследовательских работ *in vitro*Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN для ПЦР

Кат.№	Количество
MUST-50	50 реакций
MUST-100	100 реакций

Качество МастерМикса гарантируется на протяжении не менее 1 года, при хранении всех реактивов при -20°C

**Внимание!**

Перед использованием необходимо выдержать МастерМикс при комнатной температуре до полного размораживания (~30 мин.), интенсивно перемешать и отцентрифугировать.

**Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN****1X:**

UltraSmarTaq полимераза

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl<sub>2</sub> – 1,5mM

Стабилизатор/энхансер

Краски для электрофореза (**Xylene****Cyanol+OrangeG**)

Стерильная вода для ПЦР -5мл

(прозрачная крышка)

Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.

**Описание:**

**Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN** рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов.

**Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN** смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

Основой **Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN** является термостабильная химерная **UltraSmarTaq полимераза**, обладающая высокой процессивностью, позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 65%.

**UltraSmarTaq** полимераза обладает повышенной термоустойчивостью, а также резистентности к различным ингибиторам ПЦР ( в частности компонентов крови), за счет модификации фермента.

**UltraSmarTaq** полимераза позволяет проводить амплификацию с модифицированными трифосфатами ( dUTP), что дает возможность использовать данный продукт в «анти-контаминационной» ПЦР в комбинации с пост-ПЦР обработкой UDG.

Высокая процессивность и термостабильность **UltraSmarTaq** полимеразы позволяют значительно уменьшить время амплификации, сократив его практически в 2 раза по сравнению со «стандартной» ПЦР ( для проведения так называемой "fast-PCR" необходимо использование амплификаторов с большой скоростью нагрева/охлаждения образца при амплификации), с сохранением эффективности ПЦР и увеличением выхода ПЦР –продукта.

Наличие у **UltraSmarTaq полимеразы** 5'->3' экзонуклеазной активности позволяет использовать в ПЦР в «реальном времени» практически во всех методах «real-time» амплификации, включая Taq man - и другие модификации зондов.

Неоспоримым преимуществом **UltraSmarTaq полимеразы** , по сравнению с известными ферментами на основе Taq-полимеразы, является возможность амплификации ДНК непосредственно из образца крови, практически вне зависимости от типа стабилизатора – гепарин, цитрат или EDTA.

Фермент стабилен и эффективен при концентрациях крови в образце вплоть до 10-15%.

Реакционная смесь, содержащая **Мастер<sup>UST</sup>МИКС GREEN** , после проведения амплификации может быть нанесена непосредственно на гель, без проведения дополнительных манипуляций ( добавления соответствующего буфера), что значительно сокращает время и экономит расходные материалы.

## Протокол амплификации с 2,5X Mas<sup>UST</sup> MIX GREEN -1525

ПЦР амплификация с использованием **UltraSmarTaq** полимеразы очень похожа на условия использования **fusion** полимераз т.е. UltraSmarTaq полимеразы лучше работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров.

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – активность **UltraSmarTaq** блокирована специфическими моноклональными антителами, что оставляет фермент не активным при температурах до 60°C. Активация фермента наступает в процессе начальной денатурации и не требует специальной стадии прогрева для активации, в противовес химически модифицированным Taq- полимеразам.

Приготовьте мастермикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций.

### Смешайте следующие компоненты :

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР ( без ДНКаэ)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x МастерUSTМИКС GREEN	20 µL	10 µL	1X
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг

- 2,5X МастерUSTМИКС GREEN содержит 1,5mM MgCl<sub>2</sub> ( в конечной 1X концентрации). В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации MgCl<sub>2</sub> в интервале 1,5-3,5mM.

**Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.**

### Условия Амплификации

	2-х стадийный ПЦР		3-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	T°C	время	T°C	время	
Начальная денатурация	98°C	0,5-2 мин	98°C	0,5-2 мин	1
Денатурация	98°C	5-10 сек	98°C	5-10 сек	25-35
Отжиг	-	-	55-72*	10-30 сек	
Элонгация	65-72°C***	15 сек/Kb	72°C	15-30 сек/Kb**	
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	72°C	1-2 мин	1
	4°C	hold	4°C	hold	

\*- Оптимальная температура T<sub>m</sub>, рекомендуется как наименьшая температура плавления одного из праймеров, для стандартных олигонуклеотидов <22 н.п.

Для **UltraSmarTaq** полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-10°C, по сравнению с ПЦР условиями амплификации с использованием Taq полимераз или ферментов на основе **Taq** ( смеси **Taq+Pfu**, **Taq+KlenTaq**, **KlenTaq+Pfu** и т.д.)

\*\* - Для сравнительно не сложных ДНК матриц ( плазмидная ДНК, фаговая ДНК, ВАС клоны) время элонгации может быть уменьшено до 15 сек/Kb.

Для геномной ДНК ( человеческой) рекомендуется элонгация не менее 30 сек на 1 Kb, при амплификации ДНК фрагментов превышающих 2Kb. Для фрагментов ДНК длиной менее 1,5Kb. элонгацию можно ограничить 15 сек/Kb.

**НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ превышать указанное время элонгирования во избежании образования неспецифических продуктов и уменьшения выхода целевого продукта.**

\*\*\*- Для проведения двух-стадийной ПЦР, рекомендуется подбирать праймеры T<sub>m</sub> которых находится в пределах 62-70°C. В случае, если T<sub>m</sub> пары праймеров лежит в области 62-65°C, рекомендуется пользоваться простым равенством для определения стартовой температуры отжига/элонгирования – (72°+ T<sub>m</sub> праймера с минимальным значением)/2.

Если T<sub>m</sub> праймеров ( обоих) > 65°C, то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 70-72°C.

Для определения наиболее эффективной T отжига/элонгирования рекомендуется провести амплификацию в градиенте – это позволит сократить время оптимизации ПЦР.

**При использовании цельной/стабилизированной крови в качестве матрицы для амплификации – не рекомендуется превышать концентрацию крови свыше 5% ( в большинстве случаев достаточно 1-2мкл на реакцию в 50 мкл объеме), в виду образования значительного количества клеточного дебриса в процессе амплификации.**

**Не рекомендуется использовать кровь в качестве образца при проведении ПЦР в «реальном времени» в виду значительного поглощения компонентами крови флуоресцентного сигнала.**