

Информация о продукте

2,5X PCR^{BL}MIXGreenN -3500**МИКС, готовый для ПЦР из образцов крови, без выделения ДНК****Для исследовательских работ *in vitro***

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

ПЦР МИКС содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.

Качество ПЦР МИКСа гарантируется на протяжении не менее 1,5 лет, при хранении при -20°C

Описание:

ПЦР МИКС рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов с **HF-Fuzz (кат.№HF-100)**, **UltraSmarTaq (кат.№UST-100)** и **HS-StormTaq (кат.№HS-100)** полимеразы.

ПЦР МИКС смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

ПЦР МИКС применяется для амплификации ДНК из цельной/стабилизированной крови, без выделения ДНК.

Внимание!

Перед использованием необходимо выдержать ПЦР МИКС при комнатной температуре до полного размораживания (~15 мин.), интенсивно перемешать и отцентрифугировать.

Концентрация всех реагентов в Миксе оптимизирована для проведения ПЦР из образцов крови без выделения ДНК.

Реакционная смесь, после проведения амплификации, может быть нанесена непосредственно на гель, без проведения дополнительных манипуляций (добавления соответствующего буфера), что значительно сокращает время и экономит расходные материалы.

ПЦР МИКС**1X:**

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl₂ – 3,5mM

Стабилизатор/энхансер

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

Протокол амплификации с использованием 2,5X PCR^{BL}MIXGreenN -3500

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

Смешайте следующие компоненты :

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x ПЦР МИКС Праймеры	20 µL	10 µL	1X
ДНК матрица	опционно	опционно	0.3-0.5 µM каждого
UltraSmarTaq * полимераза (2,5 ед/мкл)	1 мкл	0,5мкл	> 10 нг 0,02ед/мкл

- 2,5X ПЦР МИКС содержит 3,5mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации).

Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.

*- 2,5X PCR^{BL}MIX -3500 можно использовать и с HF-Fuzz полимеразой (кат.№ HF-100), в этом случае на 50 мкл реакцию, следует добавить 0,5-1 ед. фермента.

Условия Амплификации

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

*- Оптимальная температура T_m, рекомендуется как наименьшая температура плавления одного из праймеров, для стандартных олигонуклеотидов <22 н.п.

Для UltraSmarTaq и HF-Fuzz полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-10°С, 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/Кб.

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

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_m которых находится в пределах 62-70°С. В случае, если T_m пары праймеров лежит в области 62-65°С, рекомендуется пользоваться простым равенством для определения стартовой температуры отжига/элонгирования – (72°+ T_m праймера с минимальным значением)/2.

Если T_m праймеров (обоих) > 65°С , то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 70-72°С.

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.