

## Информация о продукте

**2,5X Mas<sup>HFBL</sup>MIX -3510**Для исследовательских работ *in vitro***МастерМИКС<sup>HFBL</sup> для Hi-Fi ПЦР**

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

**МастерМИКС<sup>HFBL</sup> содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК непосредственно из образцов крови.**

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 (~15 мин.).

**МастерМикс<sup>HFBL</sup>****1X:**

**HF-Fuzz** полимераза

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl<sub>2</sub>

Стабилизатор/энхансер

Краски для электрофореза (**Xylene**

**Cyanol+OrangeG**)

Стерильная вода для ПЦР -5мл

(прозрачная крышка)

**Описание:**

**МастерМикс<sup>HFBL</sup> рекомендуется для проведения амплификации ДНК, из образцов крови без выделения ДНК.**

**МастерМикс<sup>HFBL</sup>** - смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

Основой **МастерМИКСа** является термостабильная химерная **HF-Fuzz полимераза**, обладающая высокой процессивностью, «точностью» амплификации и позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 80%.

**HF-Fuzz** полимераза модифицирована путем внесения мутаций для повышения термоустойчивости фермента и резистентности к различным ингибиторам ПЦР ( в частности компонентов крови).

Использование **МастерМикса** позволяет амплифицировать последовательности ДНК - до 1,2-1,5Kb для геномной ДНК непосредственно из образца крови, без предварительного выделения ДНК.

Для амплификации целевой ДНК можно использовать образцы крови стабилизированные **гепарином, EDTA** или **цитратом натрия**.

Использование в качестве образцов :

**- кровь/ EDTA позволяет амплифицировать образцы с содержанием до 15% крови в реакции;**

**- кровь, стабилизированная гепарином, до 15%**

**- кровь, стабилизированная цитратом, до 5%**

Превышение концентрации крови выше 10% ( 5 мкл крови на 50 мкл реакционной смеси), приводит к увеличению содержания клеточного дебриса, после проведения амплификации, что может негативно сказаться на последующей детекции ПЦР продуктов.

В большом количестве случаев, использование 1-2,5мкл крови бывает достаточно для амплификации ДНК.

Высокая процессивность и термостабильность **HF-Fuzz** полимеразы позволяют значительно уменьшить время амплификации, сократив его практически в 2 раза.

**МастерМикс<sup>HFBL</sup>** содержит оптимизированную концентрацию **MgCl<sub>2</sub>**, которая достаточна для эффективной амплификации ДНК непосредственно из образца крови.

В качестве объекта исследования также могут быть использованы и другие образцы – пятна крови, архивные образцы крови и т.д. Эффективность амплификации будет идентичной/выше, чем при амплификации жидкой крови.

Реакционная смесь, содержащая **МастерМикс<sup>HFBL</sup>**, 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 ДНК из образцов крови, без выделения ДНК

ПЦР амплификация с использованием **HF-Fuzz** полимеразы близка к условиям использования **Phusion-HF** полимеразы (**ThermoFisher**), **Q5** полимеразы (**NEB**), **iProof** полимеразы (**BioRad**) т.е. **HF-Fuzz** полимеразы лучше работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров. Собрать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – т.к фермент обладает невысокой остаточной активностью при комнатной температуре. 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 ДНКаз)	до 50µL	до 25µL	
2.5x МастерМикс <sup>HFBL</sup>	20µL	10µL	1X
Праймеры	x	x	0.3-0.5 µM каждого
Образец крови*	1-5 мкл	0.5-2,5мкл	

- 2,5X Матер Микс<sup>HFBL</sup> содержит оптимальное количество  $MgCl_2$ , в конечной 1X концентрации. В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации  $MgCl_2$ .

**\*-для образцов крови, стабилизированной цитратом не следует превышать конечную концентрацию крови 2,5-5% (1-2,5мкл для реакций в конечном объеме 50мкл).**

\*-В качестве образца могут быть использованы образцы пятен крови (цельной или стабилизированной) на бумажном носителе. В случае использования образцов с **FTA-карт (Whatman)** следуйте инструкции производителя для подготовки пробы к амплификации. В большинстве случаев, пятна площадью 1мм<sup>2</sup> вполне достаточно для амплификации ДНК фрагмента до 1-1,5Kb.

При внесении образца крови убедитесь, что образец находится в растворе, а не на стенке пробирки (перед проведением ПЦР рекомендуется провести центрифугирование, коротко).

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

### Условия Амплификации

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

**1)**- При амплификации геномной ДНК, для начальной денатурации достаточно 2 мин. При использовании образца крови, в качестве ДНК матрицы рекомендованное время начальной денатурации -5 мин., для полного лизиса клеток крови.

Для **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.)

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

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

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/Кb.

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

**3)**- Для проведения двух-стадийной ПЦР, рекомендуется подбирать праймеры, T<sub>m</sub> которых находится в пределах 62-70°С. В случае если T<sub>m</sub> пары праймеров лежит в области 62-65°С, 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°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.**