

HStormTaq –полимераза

Для исследовательских работ *in vitro*

Рекомбинантная HStormTaq ДНК полимераза

(Deoxynucleosidetriphosphate: DNA Deoxynucleosidyltransferase E.C. 2.7.7.7.)

Кат.№	Количество
HST-250	250 ед.
HST-500	500 ед.
HST-1000	1000 ед.

Источник:

Штамм *Thermus Aquaticus YTI*

Специфические мышинные анти-Taq антитела

Описание:

HStormTaq полимераза представляет собой смесь термостабильного белка, модифицированного слиянием с неспецифически связывающим ДНК доменом, выделенного из рекомбинантного штамма *E.coli*, несущего ген модифицированной полимеразы *Thermus Aquaticus YTI* и **специфических могоклональных антител.**

HStormTaq полимераза не обладает активностью в условиях подготовки ПЦР реакции (+4°C, комнатная температура), что приводит к улучшению специфичности по сравнению со стандартной **Taq** полимеразой, давая возможность проведения ПЦР в режиме "hot-start".

HStormTaq полимераза позволяет избежать проблем «мисс-прайминга» и образования праймерных дуплексов в ПЦР.

Активация фермента (диссоциация комплекса) происходит автоматически в процессе первого цикла денатурации ДНК (при T выше 70°C)

Термостабильная химерная **HStormTaq** полимераза, обладающая высокой процессивностью, позволяет амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 65%.

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

HStormTaq 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 **HStormTaq** 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.

Отсутствие у **HStormTaq** полимеразы 5'->3' экзонуклеазной активности **не позволяет** использовать фермент в ПЦР в «реальном времени» с Taq map -зондами и другими модификациями зондов.

Неоспоримым преимуществом **HStormTaq** 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%.

Качество **HStormTaq** полимеразы гарантируется на протяжении не менее 1 года, при хранении -20°C

HStormTaq полимераза

Конц.: **2,5ед. мкл**

Единица Активности

За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию за 30 минут при +74°C.

Буфер для хранения/разбавления	20mM Tris-HCL (pH 8.0);100mM KCL;0.1mM EDTA;0.5% Tween-20, стабилизаторы
Амплификационный буфер	2,5X Uni Буфер-1500
Применение	<ul style="list-style-type: none"> - мультиплекс-ПЦР - рекомендовано - «низкокопийная» амплификация ДНК - высокоспецифичная ПЦР - ПЦР в «реальном времени» -«direct-blood» ПЦР
Неспецифические активности	Эндо - и экзонуклеазные активности не обнаруживаются при проведении контрольных тестов HStormTaq ДНК полимеразы.
Условия хранения	Хранить HStormTaq ДНК полимеразу при -20 ^o C
Условия транспортировки	Можно транспортировать при комнатной температуре. При транспортировке более 3-х дней, желательно использовать лед или хладагент.
Концентрация	2,5 ед./мкл

Протокол амплификации с HStormTaq ДНК полимеразой

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

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – активность **HStormTaq** 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 ДНКаз)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x R ^{TB} Буфер-1500	20 µL	10 µL	1X
2,5mM dNTP's MIX	4µL	2µL	200µM
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг (геномная ДНК)
HStormTaq полимераза (2,5ед/мкл)	1 мкл	0.5 мкл	0,02 ед./мкл

- **2,5X R^{TB} Буфер-1500** содержит 1,5mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации).

В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации MgCl₂ 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
	Т°C	время	Т°C	время	
Начальная денатурация ¹⁾	98°C	2-5 мин	98°C	2-5 мин	1
Денатурация	98°C	5-10 сек	98°C	5-10 сек	25-35
Отжиг	-	-	55-72 ²⁾	10-30 сек	
Элонгация	65-72°C ³⁾	15 сек/Kb	72°C	15-30 сек/Kb ²⁾	1
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	72°C	1-2 мин	
	4°C	hold	4°C	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 **HStormTaq** 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.)

2)- Оптимальная температура T_m, 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/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 избежание образования неспецифических продуктов и уменьшения выхода целевого продукта.

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

Если T_m 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.