

iQExStaq –полимераза

Для исследовательских работ *in vitro*

Рекомбинантная iQExStaq ДНК полимераза

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

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

Источник:

Штамм *Thermus Aquaticus YTI*

Специфические мышинные анти-Taq антитела

Описание:

iQExStaq полимераза представляет собой смесь термостабильного фермента, модифицированного слиянием с неспецифически связывающим ДНК доменом, не обладающего не 5'->3' ни 3'->5' экзонуклеазными активностями и «хот-старт» SmarTaq полимеразы, выделенной из рекомбинантного штамма *E.coli*, несущего ген полимеразы *Thermus Aquaticus YTI* и блокированной **специфическими могоклональными антителами.**

iQExStaq 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".

iQExStaq 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 **iQExStaq** полимераза, обладающая высокой процессивностью, позволяет амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 80%.

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

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

Наличие у **iQExStaq** 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 **iQExStaq** 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 5%.

iQExStaq полимераза может быть использована в прямой амплификации ДНК различных **растительных тканей**, без выделения ДНК из исследуемого образца.

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

iQExStaq 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 iQEx Буфер-1500****Применение**

- высокоспецифичная ПЦР
- мультиплекс-ПЦР
- «низкокопийная» амплификация ДНК
- амплификация GC-богатых участков ДНК
- ПЦР в «реальном времени»
- «direct-blood» ПЦР
- «direct-plant» ПЦР

Неспецифические активности

Эндо - и экзонуклеазные активности не обнаруживаются при проведении контрольных тестов ***IQExStaq*** ДНК полимеразы.

Условия хранения

Хранить ***IQExStaq*** ДНК полимеразу при -20°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 IQExStaq ДНК полимеразой

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

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – активность **IQExStaq** 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 IQEx Буфер-2000	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)
IQExStaq полимеразы (2,5ед/мкл)	1 мкл	0.5 мкл	0,02 ед./мкл

- **2,5X IQEx Буфер-2000** содержит 2,0 mM 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	2-10 сек	30-35
Отжиг	-	-	55-72²⁾	5-15 сек	
Элонгация	65-69°C³⁾	15 сек/Kb	72°C	15-30 сек/Kb²⁾	
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	72°C	1-2 мин	1
	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 **IQExStaq** 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) 64°C-66°C, то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 69-72°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.