

2,5X Mas^{HF}MIX -1510Для исследовательских работ *in vitro*МастерМИКС^{HF} для Hi-Fi ПЦР

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

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

Внимание!

Перед использованием необходимо выдержать **МастерМикс** при комнатной температуре (~15 мин.).

МастерМикс^{HF}**1X:**

HF-Fuzz полимеразы

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl₂ – 1,5mM

Стабилизатор/энхансер

Стерильная вода для ПЦР -5мл

(прозрачная крышка)

МастерМИКС^{HF} содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.

Описание:

МастерМикс^{HF} рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов.

МастерМикс^{HF} смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

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

HF-Fuzz полимеразы модифицирована путем внесения мутаций для повышения термоустойчивости фермента, а также резистентности к различным ингибиторам ПЦР (в частности компонентов крови).

Использование **МастерМикса** позволяет амплифицировать длинные последовательности ДНК - до 12Kb для геномной ДНК и до 20Kb для менее сложных ДНК последовательностей

Наличие у фермента «корректирующей» 3'->5' активности позволяет амплифицировать протяженные фрагменты ДНК с высокой точностью, для последующего клонирования, секвенирования.

В отличие от других ферментов на основе Pfu-полимеразы, **HF-Fuzz** полимеразы 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 **HF-Fuzz** полимеразы позволяют значительно уменьшить время амплификации, сократив его практически в 2 раза (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 **HF-Fuzz** полимеразы 5'->3' экзонуклеазной активности не позволяет использовать фермент с Taqman- пробами.

МастерМикс^{HF} содержит **1,5mM MgCl₂**

Для получения оптимальных результатов может потребоваться оптимизация концентрации Mg²⁺ в пределах 1,5 -3,5mM

Протокол амплификации с HF-Fuzz ДНК полимеразой

ПЦР амплификация с использованием **HF-Fuzz** полимеразы очень похожа на условия 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 ^{HF}	20µL	10µL	1X
Праймеры			0.3-0.5µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг

- 2,5X Мастер Микс^{HF} 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°С	время	Т°С	время	
Начальная ¹⁾ 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 ²⁾	10-30 сек	
Элонгация	65-72°С ³⁾	15 сек/Kb	72°С	15-30 сек/Kb ²⁾	
Финальная элонгация	72°С 4°С	1-2 мин hold	72°С 4°С	1-2 мин hold	1

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_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°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.