

2,5X iQRB -2000

2,5X iQ RB, реакционный буфер для ПЦР из образцов крови и растительной ткани, без выделения ДНК

Для исследовательских работ *in vitro*

Кат.№	Количество	2,5XiQRB содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.
iQRB-50	50 реакций	
iQRB -100	100 реакций	

Качество 2,5X iQ RBa

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

Описание:

2,5XiQRB рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов с **HF-Fuzz (кат.№HF-100)**, **UltraSmarTaq (кат.№UST-100)** и **iQExStaq (кат.№iQST-250)** полимеразы.

2,5XiQRB реакционный буфер, содержащий все компоненты оптимизированного реакционного буфера, Mg (1x-2,0mM), стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

2,5X iQ RB применяется для амплификации ДНК из цельной/стабилизированной крови и растительных образцов, без выделения ДНК.

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

2,5X iQ RB

1X:

Компоненты реакционного буфера
MgCl₂ – 2,0mM
Стабилизатор/энхансер

2,5XiQRB может быть поставлен дополнительно в двух вариантах:

2,5X iQ RB-200R – содержит, краситель для электрофореза (Orange G), и позволяет наносить амплификат для электрофоретической детекции непосредственно на агарозный гель без дополнительных манипуляций.

2,5X iQ RB-20GR – содержит, два красителя для электрофореза (Orange G+Хуlen Cyanol), и позволяет наносить амплификат для электрофоретической детекции непосредственно на агарозный гель без дополнительных манипуляций.

Протокол амплификации с использованием 2,5X iQ RB -2000

Приготовьте ПЦР МИКС для соответствующего количества образцов (+1), 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 RB	20 µL	10 µL	1X
2,5mM dNTP's MIX	4 µL	2 µL	0,2mM
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг
UltraSmarTaq * полимераза (2,5 ед/мкл)	1 мкл	0,5мкл	0,02ед/мкл

- **2,5X iQRB** содержит 2,0 mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации). **Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.**

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

Для проведения амплификации с **iQExStaQ (кат.№iQST-250)** полимеразой в реакцию на 50 мкл, следует добавить 1 мкл. Фермента, с концентрацией 2,5 Ед.мкл.

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	
Отжиг	-	-	55-72*	10-30 сек	25-35
Элонгация	65-72°С***	15 сек/Kb	72°С	15-30 сек/Kb**	
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 +3-5°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/Kb.

Для геномной ДНК 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 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) 64-66°С , то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 69-72°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.