

**StormTaq ДНК полимеразы**Для исследовательских работ *in vitro***Рекомбинантная StormTaq ДНК полимеразы**

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

Кат.№	Количество	Источник:
FT-100	100ед.	Штамм <i>Thermus Aquaticus YT1</i>
FT-500	500ед.	
<b>Описание</b>		<p><b>StormTaq</b> ДНК полимеразы представляет собой химерный термостабильный белок, модифицированный <b>удалением N-концевых аминокислот</b>, и неспецифически связывающего ДНК термостабильного домена, выделенный из рекомбинантного штамма <i>E.coli</i>.</p> <p><b>StormTaq</b> ДНК полимеразы катализирует полимеризацию нуклеотидов в dsДНК в направлении от 5'-&gt;3' в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>, также, как и полноразмерный фермент. Фермент <b>не</b> обладает 5'-&gt;3' экзонуклеазной активностью. <b>StormTaq</b> полимеразы обладает большей термостабильностью и процессивностью по сравнению с Taq полимеразой.</p> <p>В <b>StormTaq</b> внесены точечные мутации для придания ферменту большей устойчивости при работе с объектами, содержащими значительное количество ингибиторов ПЦР (в частности компонентов крови).</p>
<b>Единица Активности</b>		За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию за 30 минут при +72°C.
<b>Буфер для хранения/разбавления</b>		10mM К-фосфатный буфер (pH 7.0); 100mM NaCl; 0.5mM EDTA; 1mM DTT; 50% глицерин, 0.01% Tween-20
<b>Амплификационный буфер 2,5X</b>		<b>2,5X UniBuffer-1500</b> содержит 1,5mM MgCl <sub>2</sub> и стабилизаторы фермента. Для оптимизации условий ПЦР возможно потребуются подбор оптимальной концентрации Mg в пределах 1,5-3,5mM (1X) Наличие стабилизаторов в <b>2,5X Uni Buffer-1500</b> может понижать температуру плавления праймеров, по сравнению с условиями ПЦР для Taq полимеразы на 1-2 °C.
<b>Применение</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- ПЦР</li> <li>- "fast"-ПЦР</li> <li>- "direct blood" ПЦР</li> <li>- "real-time" ПЦР</li> </ul>
<b>Неспецифические активности</b>		Эндо - и экзонуклеазные активности не обнаруживаются после инкубации в течение 2-х и 1-го часа, соответственно, 1 мкг, ДНК фага λ и 0.22 мкг ДНК фага λ, гидролизованного рестриктазой EcoR I, при 72°C в присутствии 15-20 ед. активности <b>StormTaq</b> ДНК полимеразы.
<b>Условия хранения</b>		Хранить <b>StormTaq</b> ДНК полимеразу при -20°C
<b>Условия транспортировки</b>		Можно транспортировать при комнатной температуре. При транспортировке более 3-х дней, желательно использовать лед или хладагент.
<b>Концентрация</b>		<b>2,5 ед/мкл</b>

## Протокол амплификации с StormTaq ДНК полимеразой

ПЦР амплификация с использованием StormTaq полимеразы очень похожа на условия использования стандартной KlenTaq полимеразы, т.е. для StormTaq полимеразы успешнее работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров.

Собирать ПЦР реакцию рекомендуется на льду (+4°C).

Приготовьте мастермикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций.

### Смешайте следующие компоненты на льду:

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x Реакционный буфер*	20 µL	10 µL	1X
2,5 mM MIX dNTPs	4 µL	2 µL	0.2 mM каждого
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица**	опционно	опционно	От 20 нг
<b>StormTaq</b> полимеразы (2,5 ед/µl)	0,5-1 µL	0,25-0.5 µL	0.02U/µL

\*- 2,5X Реакционный буфер для StormTaq содержит 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (в конечной 1X концентрации). В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации MgCl<sub>2</sub> в интервале 1,5-2,5mM.

Рекомендованный объем ПЦР реакции – 30-50 мкл.

\*\* - ДНК матрица может быть заменена на образец цельной крови или крови, стабилизированной EDTA

( до конечной концентрации крови в реакционной смеси 5%).

В случае использования образца крови, в качестве объекта исследования, необходимо увеличить 1X концентрацию Mg до **3-3,5mM**.

### Условия Амплификации

	3-х стадийный ПЦР (ДНК матрица)		3-х стадийный ПЦР (кровь)		Кол-во циклов
	Т°C	время	Т°C	время	
<b>Начальная денатурация</b>	95°C	2 мин	98°C	5-10 мин	1
<b>Денатурация</b>	94-95°C	5-15 сек	98°C	5-10 сек	30-35
<b>Отжиг</b>	55-72*	10-15 сек.	65-72*	10-15 сек	
<b>Элонгация</b>	72°C	15-30 сек/Kb	72°C	15-30 сек/Kb**	
<b>Финальная элонгация</b>	72°C	5-7 мин	72°C	5-7 мин	1
	4°C	hold	4°C	hold	

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

Для **StormTaq** полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-6°C, по сравнению с ПЦР условиями амплификации с использованием «стандартный» Taq полимераз

\*\* - 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 15-30 сек на 1 Kb, в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента.