

Информация о продукте

2,5X PCR^{HFBL}MIX -3500

ПЦР МИКС готовый для ПЦР

Для исследовательских работ *in vitro*

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

ПЦР МИКС содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.

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

Описание:

ПЦР МИКС рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов с **HF-Fuzz (кат.№HF-100)**, **UltraSmarTaq (кат.№UST-100)** и **HS-StormTaq (кат.№HS-100)** полимеразы.

ПЦР МИКС смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

ПЦР МИКС применяется для амплификации ДНК из цельной/стабилизированной крови, без выделения ДНК.

Внимание!

Перед использованием необходимо выдержать ПЦР МИКС при комнатной температуре до полного размораживания (~15 мин.), интенсивно перемешать и отцентрифугировать.

Реакционная смесь, после проведения амплификации, может быть нанесена непосредственно на гель, без проведения дополнительных манипуляций (добавления соответствующего буфера), что значительно сокращает время и экономит расходные материалы.

ПЦР МИКС**1X:**

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl₂ – 3,5mM

Стабилизатор/энхансер

Краски для электрофореза (**Xylene****Cyanol+OrangeG**)

Протокол амплификации с использованием 2,5X PCR^{HFBL}MIX -3500

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

Смешайте следующие компоненты :

Компонент	50 μ L реакция	25 μ L реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50 μ L	до 25 μ L	
2.5x ПЦР МИКС	20 μ L	10 μ L	1X
Праймеры			0.3-0.5 μ M каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг
UltraSmarTaq * полимераза (2,5 ед/мкл)	1 мкл	0,5мкл	0,02ед/мкл

- 2,5X ПЦР МИКС содержит 3,5mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации).

Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.

*- 2,5X PCR^{HFBL}MIX -3500 можно использовать и с HF-Fuzz полимеразой (кат.№ HF-100), в этом случае на 50 мкл реакцию, следует добавить 0,5-1 ед фермента.

Условия Амплификации

	2-х стадийный ПЦР		3-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	T ^o C	время	T ^o C	время	
Начальная денатурация	98 ^o C	0,5-2 мин	98 ^o C	0,5-2 мин	1
Денатурация	98 ^o C	5-10 сек	98 ^o C	5-10 сек	25-35
Отжиг	-	-	55-72*	10-30 сек	
Элонгация	65-72 ^o C***	15 сек/Kb	72 ^o C	15-30 сек/Kb**	
Финальная элонгация	72 ^o C	1-2 мин	72 ^o C	1-2 мин	1
	4 ^o C	hold	4 ^o C	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 +3-10^oC, 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^oC. В случае, если T_m пары праймеров лежит в области 62-65^oC, рекомендуется пользоваться простым равенством для определения стартовой температуры отжига/элонгирования – (72^o+ T_m праймера с минимальным значением)/2.

Если T_m праймеров (обоих) > 65^oC, то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 70-72^oC.

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.