

Instrukcja

HS-PCR Kit 5

Kompletny zestaw odczynników do przeprowadzenia reakcji PCR w technice hot-start, zawiera polimerazę DNA *Taq*.
Stężenie 5 U/ μ l.

numer katalogowy	wielkość	stężenie
1205-200H	200 U	5 U/ μ l
1205-1000H	1000 U	5 U/ μ l

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Zalety

- kompletny zestaw odczynników polecany do rutynowych reakcji amplifikacji w technice hot-start.
- zestaw zawiera najczęściej używaną termostabilną polimerazę DNA *Taq* dla hot-start PCR.

Opis

Polimeraza DNA *Taq* jest oczyszczana ze szczepu *E.coli* niosącego plazmid z wklonowanym genem kodującym polimerazę DNA z *Thermus aquaticus*.

Enzym katalizuje dołączanie deoksynukleotydów do końca 3' dwuniciowego DNA w obecności jonów Mg^{2+} w temp. 70-80 °C.

Polimeraza DNA *Taq* nie posiada aktywności egzonukleazy 3'-5' (aktywność korekcyjna). Posiada natomiast słabą aktywność egzonukleazy 5'-3'.

Polimeraza jest efektywnie blokowana przez **przeciwciało monoklonalne anty-*Taq***.

Wymagany czas aktywacji: od 2 do 5 minut w temp. 95 °C. Nie zaleca się dłuższych czasów aktywacji.

Bufor KU zwiększa specyficzność reakcji PCR dla matryc o zwiększonej ilości struktur drugorzędowych i zawartości par GC. Przy zastosowaniu buforu KU zawsze należy wykonać kontrolne reakcje bez buforu KU.

Bufor reakcyjny I zawiera jony Mg^{2+} o stężeniu zapewniającym satysfakcjonujące wyniki większości układów doświadczalnych. Optymalizacją stężenia jonów Mg^{2+} w reakcji jest możliwość zastosowania buforu reakcyjnego III (bez jonów Mg^{2+}) i dodania do niego odpowiedniej ilości jonów Mg^{2+} w postaci załączonego do zestawu $MgCl_2$.

Skład

	1205-200H	1205-1000H	przechowywanie
RUN-HS polimeraza	200 U	1000 U	-20 °C
10 mM dNTP Mix	200 µl	4 x 200 µl	-20 °C
10x bufor I (z jonami Mg^{2+}) 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15 mM $MgSO_4$, 1% Triton X-100	1,5 ml	4 x 1,5 ml	-20 °C
10x bufor III (bez jonów Mg^{2+}) 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1% Triton X-100	1,5 ml	4 x 1,5 ml	-20 °C
5x bufor KU bez DMSO i związków toksycznych	2 ml	4 x 2 ml	-20 °C
6x bufor obciążający	1 ml	1 ml	-20 °C
25 mM $MgCl_2$	1,5 ml	2 x 1,5 ml	-20 °C
woda ultraczysta	5 ml	4 x 5 ml	-20 °C

Proponowany protokół przygotowania reakcji PCR

1. Całkowicie rozmrozić i wymieszać wszystkie komponenty niezbędne do nastawienia reakcji PCR. Krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2. Umieścić probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

	objętość reakcji PCR
składnik	25 µl
10x bufor I lub III	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	200-250 µM (0,5-0,6 µl)
starter 1	0,1-0,5 µM
starter 2	0,1-0,5 µM
RUN-HS polimeraza	1-5 U
matryca DNA	10 pg - 1 µg
5x bufor KU (opcjonalnie)	2,5-5 µl
MgCl₂ (opcjonalnie)	w zależności od potrzeb
6x bufor obciążający (opcjonalnie)	w zależności od potrzeb
woda ultraczysta	uzupełnić do 25 µl

3. Mieszanicę reakcyjną delikatnie wymieszać i zwirować.
4. Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program.

Proponowany profil hot-start PCR dla produktów do 1000 pz:

etap	temperatura	czas
wstępna denaturacja	95 °C	3-5 min
25-45 cykli	95 °C	15 s
	50-68 °C	30-60 s
	72 °C	1 min
wydłużanie końcowe	72 °C	10 min

5. Po zakończeniu reakcji próbki przechowywać w lodówce lub zamrażarce do czasu dalszych analiz.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 880-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2024-1

