

ChemTaq ДНК-полимераза с буфером

Методические указания по применению

Каталожный №	Комплектация
255321	– ChemTaq ДНК-полимераза (5 ед/мкл), 0,2 мл; – 10-х буфер для ChemTaq полимеразы, 2,5 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 1,25 мл
255322	– ChemTaq ДНК-полимераза (5 ед/мкл), 1,0 мл; – 10-х буфер для ChemTaq ДНК-полимеразы, 12,5 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 6,25 мл

1. Описание

ChemTaq ДНК-полимераза представляет собой термостабильный белок, выделенный из рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген полимеразы *polA* *Thermus aquaticus* YT1, инактивирован химическими модификациями.

Благодаря применению технологии «hot start», **ChemTaq ДНК-полимераза** не обладает ферментативной активностью в условиях приготовления ПЦР-смеси, что приводит к повышению специфичности и чувствительности реакции. Активация белка происходит автоматически при его прогревании при 95 °С в течение 15 мин.

ChemTaq ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК в направлении от 5'-к 3'-концу растущей цепи; не обладает детектируемой корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью; имеет 5'-3'-экзонуклеазную активность. Кроме того, **ChemTaq ДНК-полимераза** обладает дезоксирибонуклеотидилтрансферазной активностью, что приводит к присоединению дополнительного остатка дА на 3'-конец ПЦР-продукта.

ChemTaq ДНК-полимераза обеспечивает высокий выход ПЦР-продукта при использовании различных ДНК-матриц, при этом вероятность появления неспецифической амплификации сводится к минимуму. Фермент

позволяет амплифицировать фрагменты ДНК длиной до 5 000 п.о.

2. Область применения

- Мультиплекс-ПЦР;
- Рутинная ПЦР;
- «Низкокопийная» ПЦР;
- Высокоспецифичная ПЦР;
- ПЦР с двумеченными зондами;
- Амплификация фрагментов для ТА-клонирования.

3. Стандартный протокол использования ChemTaq ДНК-полимеразы

Для уменьшения ошибки пипетирования при постановке нескольких параллельных реакций рекомендуется приготовить общий ПЦР-премикс, содержащий все компоненты смеси (воду, дНТФ, буфер, MgCl₂, ДНК-полимеразу, праймеры) за исключением ДНК-матрицы. Объем ПЦР-премикса рассчитывается исходя из числа реакций с добавлением одного дополнительного образца. После того, как аликвоты ПЦР-премикса будут внесены в предварительно промаркированные ПЦР-пробирки, в них добавляются соответствующую ДНК-матрицу.

1. Перед использованием разморозить и тщательно перемешать все компоненты ПЦР-смеси.

2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 1. Количество вносимых компонентов приведено для одной реакции объемом 25 мкл.

Таблица 1. Состав реакционной смеси (25 мкл)

Компонент	Объем	Конечная конц.
10-кратный буфер для ChemTaq ДНК-полимеразы	2,5 мкл	1-кратный
MgCl ₂ (50 мМ)	1 мкл	2 мМ
Смесь дНТФ (каждый в концентрации 2 мМ)	2,5 мкл	200 мкМ
Прямой праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Обратный праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Зонд (50 мкМ)*	0,15 мкл	0,3 мкМ
ДНК-матрица	Определяется пользователем	0,04 фг/мкл – 4 нг/мкл
ChemTaq ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,2 мкл	0,04 ед/мкл
H ₂ O	Довести объем реакционной смеси до 25 мкл	

* – при постановке ПЦР с двумеченными зондами по методу «Taqman».

В зависимости от особенностей используемой ДНК-матрицы и задач исследования, состав реакционной смеси может быть оптимизирован:

- для амплификации с двумеченными зондами по методу «Taqman» рекомендуется использовать MgCl₂ в конечной концентрации 3–5 мМ;
- оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,05–1 мкМ;
- на одну реакцию объемом 25 мкл рекомендуется использовать 1 пг – 10 нг плазмидной, фаговой или бактериальной ДНК; 0,1–100 нг геномной эукариотической ДНК;
- концентрация **ChemTaq ДНК-полимеразы** может быть увеличена до 0,08 ед/мкл.

Допускается использование праймеров с другой начальной концентрацией.

Концентрация Зонда может находиться в диапазоне 0,1–0,4 мкМ

Рекомендуемый объем ПЦР-смеси для одной реакции – 25 мкл. Однако при необходимости объем реакционной смеси может быть изменен с **сохранением конечной концентрации** входящих в нее компонентов.

3. Аккуратно перемешать реакционную смесь и осадить капли со стенок пробирки.

4. Провести ПЦР.

Рекомендуемые условия амплификации для анализа ПЦР-продуктов с применением гелеэлектрофореза представлены в таблице 2.

Стандартная схема амплификации для проведения реакции с двумеченными зондами по методу «Taqman» представлена в таблице 3.

Таблица 2. Рекомендуемые условия амплификации (анализ ПЦР-продуктов с применением гелеэлектрофореза)

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	15 мин	1
Денатурация	95 °С	15 с	25–35
Отжиг праймеров	55–67 °С*	10 с	
Элонгация	72 °С	60 с на каждую 1 000 п.о.**	
Финальная элонгация	72 °С	5 мин	1
Хранение	4 °С	∞	1

* – в зависимости от температуры плавления праймеров;

** – длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 5 000 п.о.

Таблица 3. Рекомендуемые условия амплификации (реакция с двумеченными зондами по методу «Taqman»)

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	15 мин	1
Денатурация	95 °С	15 с	40–45
Отжиг праймеров/ считывание сигнала	55–67 °С*	30 с	
Элонгация	67 °С	15 с	

* – в зависимости от температуры плавления праймеров

4. Условия хранения и транспортировки

Буфер для хранения и разведения:

20 мМ Трис-НСl (рН 8,0); 100 мМ КСl; 0,1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТТ; 50 % глицерин; 1 % Tween-20.

Транспортирование **ChemTaq ДНК-полимеразы** осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37 °С (до 5 суток) или при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

ChemTaq ДНК-полимераза хранится при температуре от -16 °С до -24 °С.

Срок годности – 1 год.