TaqNova-RED

Polimeraza DNA

1.2017

blirt

TaqNova-RED

Polimeraza DNA

Rekombinowana termostabilna polimeraza DNA *Taq* zawierająca czerwony barwnik, izolowana z *Thermus aquaticus*, o przybliżonej masie 94 kDa, polecana do ogólnych zastosowań wymagających syntezy DNA w wysokiej temperaturze.

Zastosowanie polimerazy ***TaqNova-RED*** zmniejsza ryzyko popełnienia błędu podczas operacji związanych z przygotowaniem mieszaniny reakcyjnej (pominięcie polimerazy). W wyniku dodania polimerazy ***TaqNova-RED*** do probówki zawierającej składniki mieszaniny obserwuje się zmianę barwy roztworu (na czerwoną).

Polimeraza ***TaqNova-RED*** jest wszechstronną i łatwą w użyciu polimerazą DNA, pracującą bardzo szybko i nadzwyczaj wydajnie w różnych warunkach reakcji PCR. Można nią zastąpić inne polimerazy bez konieczności czasochłonnej optymalizacji warunków reakcji. Enzym katalizuje syntezę DNA w kierunku 5'→3', nie wykazuje aktywności 3'→5' egzonukleazy, natomiast posiada aktywność 5'→3' egzonukleazy.

Mieszaniny reakcyjne uzyskane przy użyciu polimerazy ***TaqNova-RED*** mogą być nanoszone na żel bezpośrednio po zakończonej amplifikacji, bez konieczności dodawania buforu obciążającego zawierającego barwnik. Skraca to czas oraz ułatwia przygotowanie elektroforezy agarozowej lub poliakrylamidowej.

Właściwości i zalety

- Wysoka wydajność amplifikacji przy minimalnej ilości enzymu bez konieczności czasochłonnej optymalizacji
- Podwyższona czułość reakcji PCR
- Odpowiednia do wielu różnych zastosowań
- Umożliwia otrzymanie powtarzalnych wyników
- Enzym rekombinowany o wysokiej czystości
- Amplifikuje fragmenty DNA do 5 kpz
- Czas półtrwania (ang. half-life) wynosi 45 minut w temp. 95°C
- Dodaje A na końcach 3'
- Ułatwia nastawianie reakcji PCR
- Umożliwia nanoszenie próbek na żel bezpośrednio po reakcji PCR

Zastosowania

- Wydajna amplifikacja krótkich i średnich matryc DNA
- Rutynowe reakcje PCR
- Diagnostyczny PCR
- Multiplex PCR
- Klonowanie TA

TaqNova-RED

Polimeraza DNA

Przygotowanie reakcji PCR

1. Rozmrozić odczynniki, dokładnie wymieszać, a następnie krótko zwirować.
2. Dodać następujące składniki mieszaniny do sterylnej, wolnej od nukleaz probówki PCR w kolejności zamieszczonej w tabeli poniżej.

Składnik	Sugerowana ilość na reakcję	Dopuszczalne stężenie końcowe w mieszaninie reakcyjnej
bufor 10x *TaqNova*	5 µl	1x
8 mM dNTPs Mix	5 µl	0,2 – 0,25 mM każdego dNTP
50 mM $MgCl_2$	2 µl	2 – 5 mM
starter Forward (10 µM)	1 µl	0,1 – 1,0 µM
starter Reverse (10 µM)	1 µl	0,1 – 1,0 µM
matrycowe DNA	1 – 100 ng	10 pg – 0,5 µg
DNA polimeraza 1 U/ul *TaqNova-RED*	**2 µl**	**1 – 3 U**
woda (PCR-grade)	dodać do 50 µl	

3. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną należy wymieszać przez pipetowanie lub worteksowanie i krótko zwirować.
4. Następnie umieścić w bloku grzejnym termocyklera i prowadzić reakcję PCR.

5. W poniższej tabeli zamieszczono sugerowany profil temperaturowo-czasowy.

Etap	Temperatura	Czas	
Denaturacja wstępna	94–95°C	1–5 min[1]	
Denaturacja	94–95°C	30 s	25–40 cykli[4]
Przyłączanie starterów	45–65°C[2]	30 s	
Wydłużanie	72°C	15 s–2 min[3]	
Wydłużanie końcowe	72°C	1–5 min	
Chłodzenie	4°C	∞	

1) Czas denaturacji wstępnej zależy od zawartości par GC w obrębie amplifikowanego regionu i rodzaju matrycy DNA. Dla matryc takich jak plazmidowe DNA i cDNA zaleca się stosowanie krótszych czasów etapu denaturacji wstępnej (1–2 min). Dla bardziej kompleksowych matryc (np. eukariotyczne genomowe DNA), wymagane są dłuższe czasy denaturacji wstępnej (3–5 min).
2) Temperatura przyłączania starterów zależy od sekwencji DNA oraz ich temperatury topnienia. Optymalna temperatura przyłączania jest zwykle niższa o 2–5°C niż średnia temperatura topnienia pary starterów.
3) Czas elongacji zależy od długości amplifikowanego fragmentu DNA. Zaleca się stosować 30 sekund na każde 1000 pz produktu PCR.
4) Liczba cykli zależy od liczby kopii amplifikowanego fragmentu DNA. W przypadku małych ilości matrycy DNA należy zwiększyć liczbę cykli do 40.

6. Po zakończeniu reakcji nanosić próbki bezpośrednio na żel.

Dodatkowe informacje

- Oba dołączone bufory reakcyjne mogą być testowane z polimerazą ***TaqNova-RED*** w celu określenia najbardziej odpowiednich warunków do konkretnego zastosowania. Bufor **10x *TaqNova* KCl** zalecany jest jako "bufor pierwszego podejścia" oraz do zastosowań wymagających wysokiej specyficzności. Natomiast bufor **10x *TaqNova* $(NH_4)_2SO_4$** zalecany jest do zastosowań, w których wymagana jest wysoka czułość i wydajność amplifikacji (np. do jednoczesnej amplifikacji wielu fragmentów DNA).
- Zalecane stężenie polimerazy ***TaqNova-RED*** w reakcji wynosi 0,04 U/µl. W przypadku, gdy pożądane jest inne stężenie polimerazy, może być wymagana optymalizacja stężenia jonów Mg^{2+}. Poniższa tabela przedstawia obliczenia stężenia jonów Mg^{2+} dla odpowiedniej objętości 50 mM $MgCl_2$ dodanego do reakcji.

Końcowe stężenie jonów Mg^{2+} [mM]	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**	**4,0**
	Objętość reakcji 50 µl						
50 mM $MgCl_2$ [µl]	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0

- Minimalna objętość polimerazy w reakcji PCR wynosi 1,5 µl / 50 µl dla efektywnego nanoszenia próbki na żel po zakończeniu reakcji PCR (minimalna ilość obciążnika).
- Produkty PCR mogą być nanoszone bezpośrednio na żel w zakresie objętości 5–15 µl bez konieczności mieszania próbek z roztworem do nanoszenia DNA. Elektroforeza i wizualizacja mogą być przeprowadzone zgodnie ze standardowymi procedurami.

Możliwe problemy i ich rozwiązywanie

Problemy, które mogą wystąpić podczas nastawiania reakcji PCR i analizy wyników, ich przyczyny oraz sugerowane rozwiązania są opisane na stronie: www.blirt.eu.

Bufor do przechowywania

20 mM Tris-HCl (pH 8,0 w 25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20, barwnik i dodatki, 50% (v/v glicerol)

Bufory reakcyjne

10x *TaqNova* KCl
100 mM Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40

10x *TaqNova* $(NH_4)_2SO_4$
750 mM Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C), 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (v/v) Tween 20

Definicja jednostki

Jedna jednostka to ilość enzymu wystarczająca do przyłączenia 10 nmoli deoksynukleotydów do nierozpuszczalnej frakcji DNA w czasie 30 minut w temp. 72°C w 50 µl reakcji.

Kontrola jakości

Preparat wolny od DNaz. Szczegółowo testowany w reakcjach PCR.

Polimeraza DNA ***TaqNova-RED***

Zawartość	RP20R 200 U	RP100R 1000 U	P20R-S 20 U
***TaqNova-RED* 1 U/µl** Polimeraza DNA	200 µl	1000 µl	20 µl
10x *TaqNova* KCl Bufor reakcyjny	1.25 ml	4 x 1.25 ml	100 µl
10x *TaqNova* $(NH_4)_2SO_4$ Bufor reakcyjny	1.25 ml	4 x 1.25 ml	100 µl
50 mM $MgCl_2$	1 ml	4 x 1 ml	80 µl

Przechowywanie i transport

Warunki przechowywania
Przechowywać w temp. -20°C

Warunki transportu
Transport w warunkach chłodniczych

ⓘ do badań naukowych

Data ważności
Informacja na etykiecie

BLIRT S.A.
orders@blirt.eu | www.blirt.eu