

Контактная информация:

Адрес: ООО “Дагаз”
129336, Россия, г. Москва,
Анадырский Проезд, 63, 263

Время работы: Пн – Пт, с 9.00 до 18.00

Е-mail: info@dagaz.su

Как заказать:

По e-mail: присылайте Ваш заказ на info@dagaz.su
В письме укажите название продукта, каталожный номер, количество. Не забывайте указывать название Вашей организации и контактную информацию.

По телефону/факсу: **8-926-566-85-14**

Срок выполнения заказа – 7 дней.

Все цены гарантированно ниже, чем у конкурентов – при таком же высоком качестве.

СОДЕРЖАНИЕ:

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И РЕАКТИВЫ ДЛЯ ПЦР	3
Синтез олигонуклеотидов.....	3
Немодифицированные олигонуклеотиды.....	3
Модифицированные олигонуклеотиды	3
Модифицированные нуклеозиды	6
Зонды для ПЦР в режиме реального времени.....	7
Стандартные праймеры	9
Нуклеотиды	10
Реагенты и буферы для ПЦР и ПЦР-РВ.....	11
РЕАКТИВЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА	15
НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	17
ДРУГИЕ РЕАКТИВЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ	18
ПРИЛОЖЕНИЕ	19

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография.
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота.
Ед.	– единица активности фермента.
НДС	– налог на добавленную стоимость.
н.п.	– нуклеотидная пара
о.е.	– оптическая единица.
ПААГ-электрофорез	– электрофорез в полиакриламидном геле.
ПЦР	– полимеразная цепная реакция.
ПЦР-РВ	– полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени.
РНК	– рибонуклеиновая кислота.
т.н.п.	– тысяча нуклеотидных пар.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И РЕАКТИВЫ ДЛЯ ПЦР
Синтез олигонуклеотидов.
НЕМОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Наименование и структура	Гарантированное кол-во о.е. ₂₆₀	Цена, руб/шаг
	2	12
Олигонуклеотиды, очищенные	5	16
ПААГ-электрофорезом	20	42
	100	93
	1000	930

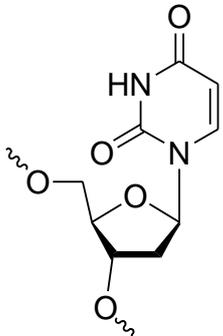
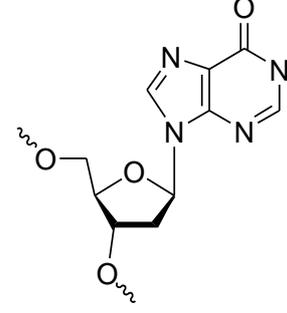
МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Модификация	Цена, руб/шаг		
	Гарантированное кол-во о.е.	5', 3'	внутренняя, (dT)
FAM	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
TET	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
JOE	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
HEX	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
R110	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог

Модификация	Гарантированное кол-во о.е.	Цена, руб/шаг	
		5', 3'	внутренняя, (dT)
TAMRA	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
R6G	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
ROX	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Ву-3 (аналог Cy3)	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Ву-3.5 (аналог Cy3.5)	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Ву-5 (аналог Cy5)	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Ву-5.5 (аналог Cy5.5)	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Dabcyl	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
ВНQ-1	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
ВНQ-2	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
ВНQ-3	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-

Модификация	Гарантированное кол-во о.е.	Цена, руб/шаг	
		5', 3'	внутренняя, (dT)
Биотин	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Аминоалкил	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Алкин	1	дог	дог
	3	дог	дог
	5	дог	дог
	10	дог	дог
Фосфат	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
Треблер (растроитель)	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
TEG (Spacer 9)	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-
HEG (Spacer 18)	1	дог	-
	3	дог	-
	5	дог	-
	10	дог	-

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ

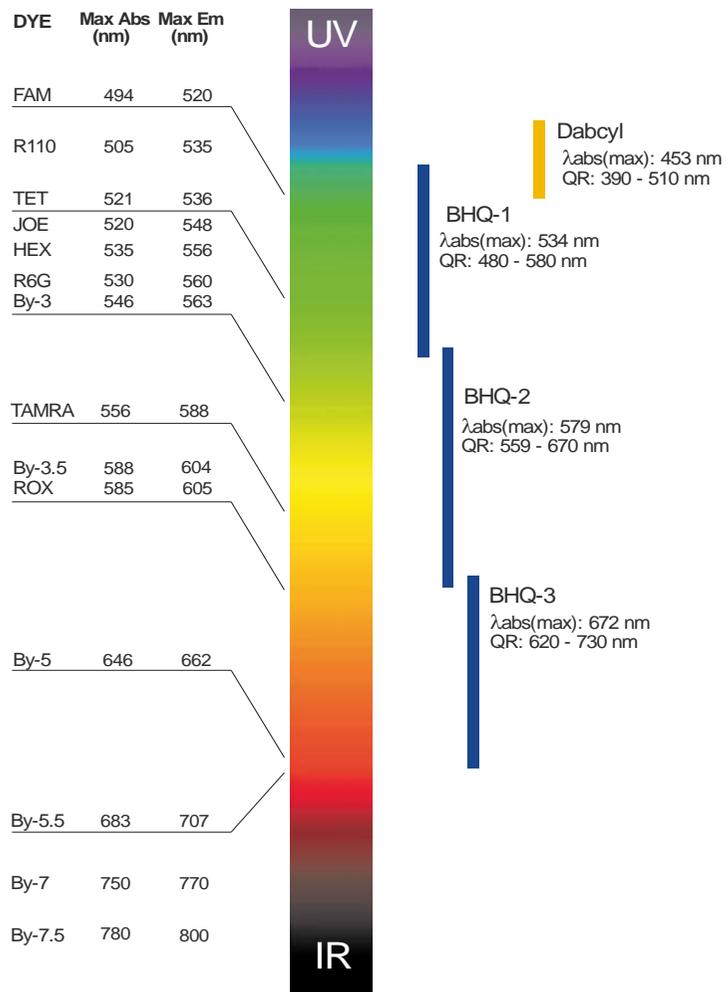
Модификация	Гарантированное кол-во о.е.	Цена, руб/шаг
dU (дезоксиуридин) 	1	ДОГ
	3	ДОГ
	5	ДОГ
	10	ДОГ
dIn (дезоксиинозин) 	1	ДОГ
	3	ДОГ
	5	ДОГ
	10	ДОГ

ЗОНДЫ ДЛЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Все зонды (пробы) очищаются при помощи ПААГ-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Контроль качества ведется при помощи электрофореза, ВЭЖХ и UV-vis спектроскопии.

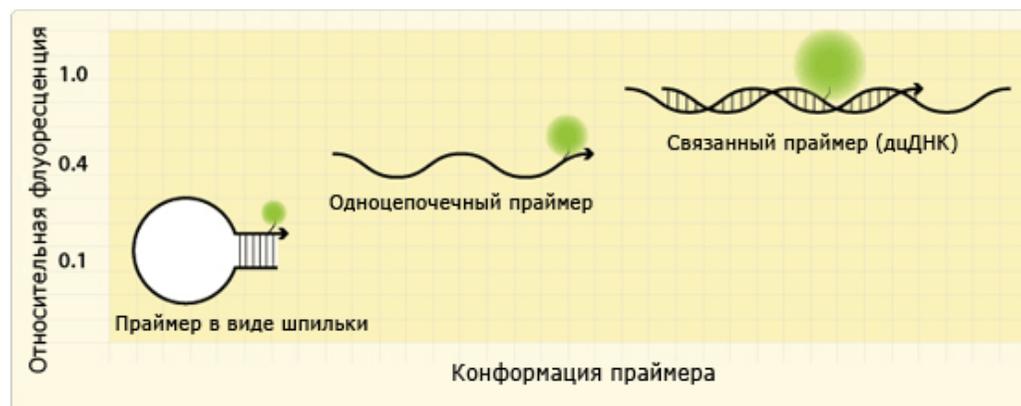
Тип зонда	Цена, руб			
	1 о.е.	3 о.е.	5 о.е.	10 о.е.
FAM – BHQ-1	1150	2500	6050	дог.
FAM – Dabcyl	1150	2500	6050	дог.
R110 – BHQ-1	1350	2900	7100	дог.
TET – BHQ-1	1350	2900	7100	дог.
JOE – BHQ-1/BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
R6G – BHQ-1/BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
HEX – BHQ-1/BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
TAMRA – BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
ROX – BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
By-3 – BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
By-3.5 – BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
By-5 – BHQ-2	1350	2900	7100	дог.
By-5.5 – BHQ-2/BHQ-3	1350	2900	7100	дог.
LUX праймеры (FAM)	720	1750	4200	дог.
LUX праймеры (JOE)	900	2250	5400	дог.

LUX ПРАЙМЕРЫ



LUX (Light Upon eXtension) – новый чувствительный, специфичный и недорогой метод проведения ПЦР в режиме реального времени. Набор LUX-праймеров для проведения ПЦР-РВ состоит из одного флуоресцентно меченного праймера и соответствующего немеченого праймера.

Технология LUX проста:



Шпилечная структура меченного праймера обеспечивает тушение флуорофора, поэтому использование специального тушителя не нужно. На стадии денатурации шпилечная структура праймера разрушается, а на стадии отжига праймер связывается с комплементарным участком ДНК. На стадии элонгации флуорофор разгорается, при этом возникает флуоресцентный сигнал.

При проведении ПЦР-РВ с LUX-праймером достигается высокая чувствительность: рутинно детектируются 100 копий ДНК и меньше. LUX-праймеры дают схожие значения C_t по сравнению с TaqMan-зондами и значительно превосходят по чувствительности ПЦР-РВ с красителем ZUBR Green-1.

LUX-праймеры доступны с двумя различными флуорофорами – FAM и JOE, что обеспечивает мультиплексность ПЦР. Дополнительным преимуществом метода перед TaqMan-зондами является возможность снятия кривых плавления.

СТАНДАРТНЫЕ ПРАЙМЕРЫ

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
Случайные гексамеры, 100 мкМ (Random Hexamers) 5'-nnnnnn-3'	0050.2	0,25 мл	240
Случайные нонамеры, 100 мкМ (Random Nonamers) 5'-nnnnnnnnn-3'	0051.2	0,15 мл	240
Случайные декамеры, 100 мкМ (Random Decamers) 5'-nnnnnnnnnn-3'	0052.2	0,15 мл	240
Олиго(тимидин)₁₂, 100 мкМ Oligo(dT) ₁₂	0053.2	0,15 мл	240
Олиго(тимидин)₁₆, 100 мкМ Oligo(dT) ₁₆	0054.2	0,1 мл	240
Олиго(тимидин)₁₈, 100 мкМ Oligo(dT) ₁₈	0055.2	0,1 мл	240

Нуклеотиды

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
Смесь дНТП (dNTPs) для ПЦР, 10× (Содержит 2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ)	1201.2	1 мл	ДОГ
Смесь дНТП (dNTPs) для ПЦР, 50× (Содержит 10 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ)	120с.2	1 мл	ДОГ
дНТП (dNTPs) комплект для ПЦР (100 мМ)	120b.2	4 × 0,1 мл	ДОГ
Раствор дАТФ (dATP), 100 мМ	1202.2	0,1 мл	ДОГ
Раствор дЦТФ (dCTP), 100 мМ	1203.2	0,1 мл	ДОГ
Раствор дГТФ (dGTP), 100 мМ	1204.2	0,1 мл	ДОГ
Раствор дТТФ (dTTP), 100 мМ	1205.2	0,1 мл	ДОГ

Реагенты и буферы для ПЦР и ПЦР-РВ

Tornado полимераза (hot-start)

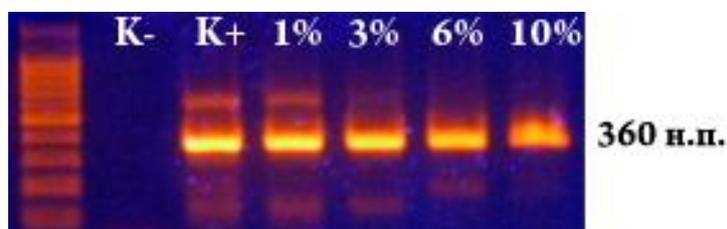
Tornado полимераза является уникальным ферментом, обладающим повышенной термостабильностью, устойчивостью к ингибиторам ПЦР и повышенной скоростью синтеза ДНК по сравнению с обычной *Taq* полимеразой.

Основное предназначение:

- ПЦР с использованием цельной крови без выделения ДНК.
- ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Real time PCR) с использованием интеркалирующих красителей (SYBR Green I, ZUBR Green-1).
- Рутинный ПЦР без оптимизации условий.

Преимущества:

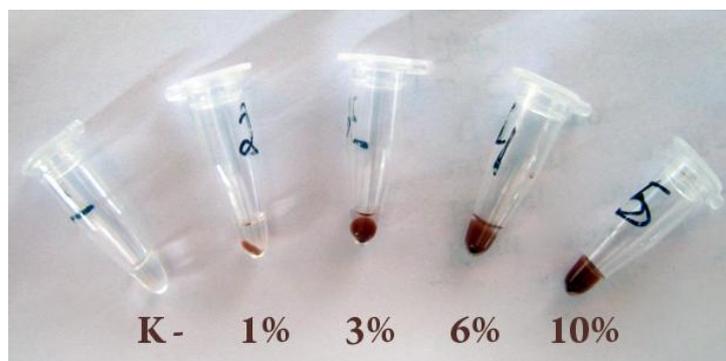
- **Повышенная чувствительность и специфичность** за счет применения технологии hot-start.
- **Повышенная скорость синтеза** (30 секунд для амплификации фрагмента длиной 1 т.н.п.).
- **Возможность использование цельной крови** (до 15% от суммарного объема ПЦР реакции) без предварительной очистки ДНК.
- **Повышенная толерантность к ингибированию SYBR Green I.** Обычная *Taq*-полимераза ингибируется **SYBR Green I** в концентрациях превышающих 0,15X, в то время как **Tornado** выдерживает **SYBR Green I** вплоть до концентрации 0,6X.



«K-» - отрицательный контроль

«K+» - положительный контроль с использованием 10 нг очищенной ДНК

1%-10% - процент (объем/объем) содержание цельной крови в ПЦР



Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
PrimeTaq ДНК-полимераза, без буфера (концентрация 5 Ед./мкл)	1800.2	1000 Ед.	дог
	1800.4	5000 Ед.	дог
PrimeTaq ДНК-полимераза, с буферами (5 Ед./мкл. Каждая 1000 Ед. полимеразы комплектуется 3 мл буфера А, 3 мл буфера АМ и 2 мл MgCl ₂)	1801.2	1000 Ед.	дог
	1801.4	5000 Ед.	дог
High-Fidelity ДНК-полимераза в комплекте с буферами (5 Ед./мкл) Специально подобранная смесь <i>Taq</i> и <i>Pfu</i> ДНК-полимеразы. Обладает повышенной точностью синтеза и лучшей эффективностью по сравнению с <i>Taq</i> -полимеразой. Длина получаемого ампликона – до 10 000 пар оснований	1803.2	500 Ед.	дог
	1803.4	1000 Ед.	дог
<i>Pfu</i> ДНК-полимераза, с буфером (концентрация 2 Ед./мкл)	1804.2	200 Ед.	дог
Tornado F ДНК-полимераза (2 Ед./мкл, в комплекте с буфером) Предназначена для рутинной амплификации образцов, содержащих ингибиторы ПЦР, с последующей детекцией продуктов амплификации с помощью геля электрофореза.	1805.2	500 Ед.	дог
	1805.4	1000 Ед.	дог
Tornado B ДНК-полимераза (2 Ед./мкл, в комплекте с буфером) Предназначена для ПЦР с использованием цельной крови	1806.2	500 Ед.	дог
	1806.4	1000 Ед.	дог
Tornado S ДНК-полимераза (2 Ед./мкл, в комплекте с буфером) Предназначена для ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей <i>Zubr Green-1</i> или <i>Sybr Green-1</i> .	1807.2	500 Ед.	дог
	1807.4	1000 Ед.	дог
Quick-Load Taq 2X Master Mix Готовая смесь для ПЦР. В состав входят: ДНК полимеразы, дНТФ, Mg ²⁺ , реакционный буфер, краситель для нанесения на гель	0046.4	3 мл (на 240 реакций)	дог

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
Т-буфер F, 2× Буфер для Tornado F <i>Taq</i> ДНК-полимеразы	004e.2	10 мл	ДОГ
Т-буфер B, 2× Буфер для Tornado B <i>Taq</i> ДНК-полимеразы	004d.2	10 мл	ДОГ
Т-буфер S, 2× Буфер для Tornado S <i>Taq</i> ДНК-полимеразы	004f.2	10 мл	ДОГ
MgCl₂ раствор, 50 мМ	0011.3	4 × 1 мл	ДОГ
	0011.4	10 мл	ДОГ
Буфер для <i>Taq</i> полимеразы «АМ», 10×, содержащий MgCl₂ (650 мМ Трис-НСl, 166 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 мМ MgCl ₂ , 0,2% Твин 20, рН 8,8)	0012.3	4 × 1 мл	ДОГ
	0012.4	10 мл	ДОГ
Буфер для <i>Taq</i> полимеразы «А», 10×, без MgCl₂ (650 мМ Трис-НСl, 166 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2% Твин 20, рН 8,8)	0013.3	4 × 1 мл	ДОГ
	0013.4	10 мл	ДОГ
Буфер для <i>Taq</i> полимеразы «КМ», 10×, содержащий MgCl₂ (100 мМ Трис-НСl, 500 мМ КСl, 15 мМ MgCl ₂ , 0,8% Nonidet P40, рН 8,8)	0030.3	4 × 1 мл	ДОГ
	0030.4	10 мл	ДОГ
Буфер для <i>Taq</i> полимеразы «К», 10×, без MgCl₂ (100 мМ Трис-НСl, 500 мМ КСl, 0,8% Nonidet P40, рН 8,8)	0031.3	4 × 1 мл	ДОГ
	0031.4	10 мл	ДОГ
ZUBR Green-1 (аналог SYBR Green I), 100× раствор в ДМСО, для ПЦР-РВ	0010.2	100 мкл	ДОГ
Эталонный краситель ROX, 50× (reference dye) Позволяет нормализовать колебания сигнала, не связанные с ПЦР, и обеспечивает нулевую линию в мультиплексных реакциях (25 мкМ ROX, 20 мМ Трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,01% Твин 20, рН 8,4)	0033.4	1 мл	ДОГ
Эталонный краситель FAM, 50× (reference dye) (1 мкМ FAM, 20 мМ Трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,01% Твин 20, рН 8,4)	0043.4	1 мл	ДОГ

Краситель флуоресцентный ZUBR Green-1

Краситель флуоресцентный **ZUBR Green-1** является близким аналогом красителя SYBR Green I, одного из наиболее чувствительных красителей, применяемых для детекции двуцепочечных молекул ДНК при электрофорезе в агарозных и полиакриламидных гелях, а также в качестве флуорофора в полимеразной цепной реакции в реальном времени. Чувствительность этого красителя приблизительно в 25 раз выше, по сравнению с наиболее распространенным до настоящего времени бромистым этидием (EtBr).

Спектральные характеристики: будучи связанным с двухнитевой ДНК, **ZUBR Green-1** имеет максимум поглощения на 497 нм, а также вторичные максимумы на 390 и 280 нм. Максимум флуоресценции красителя – 520 нм.

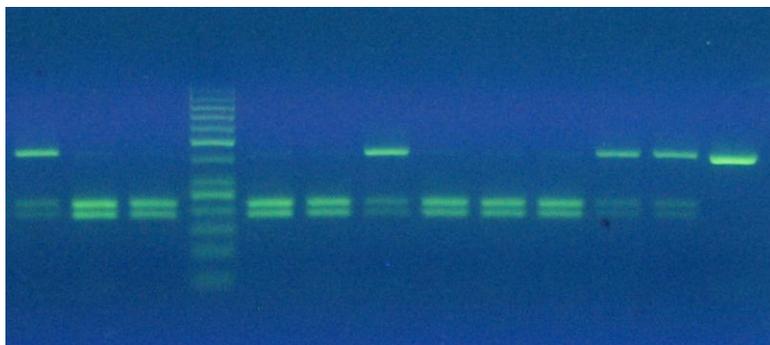
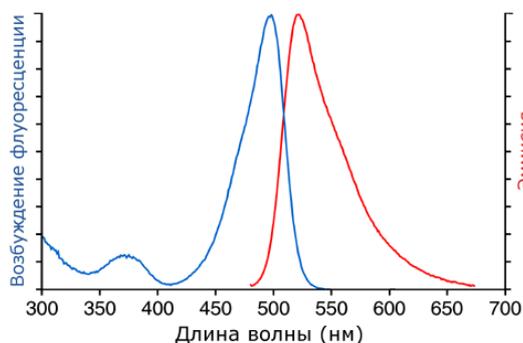
Использование ZUBR Green I.

■ Окрашивание ДНК после электрофореза (рекомендованный метод)

- Разморозьте аликвоту 10 000× **ZUBR Green-1** при комнатной температуре.
- Кратковременно центрифугируйте для сбора всей жидкости внизу пробирки.
- Приготовьте достаточное количество окрашивающего раствора в пластиковой посуде, для этого 10000× концентрат Zubr Green I разведите в 10000 раз в однократном свежем буфере TE, TAE или TBE (pH 7,5-8,0). (Например, 10 мкл концентрата **ZUBR Green-1** добавьте к 100 мл буфера). Концентрация красителя в конечном растворе должна быть 1X для окраски ДНК и 2X – для РНК. Готовый раствор для окраски (1X) годен в течение 3 дней при хранении **в темноте** при комнатной температуре и несколько недель при хранении при 2-8°C.

- Окрашивайте гели в полипропиленовом (НЕ В СТЕКЛЯННОМ - **ZUBR Green-1** очень хорошо адсорбируется на стекле) контейнере при легком перемешивании при комнатной температуре в течение 10-30 минут. Окрашивание желательно проводить в условиях, при которых доступ света к окрашивающему раствору был бы минимальным.

- Окрашенные гели визуализируйте с помощью трансиллюминатора при длинах волн 254 или 312 нм.



- Окрашивание ДНК в течение электрофореза. Для этого краситель **Zubr Green-1** добавляют в агарозные или акриламидные гели непосредственно перед их заливкой. Конечная концентрация красителя в геле - 1X.

- В ПЦР реального времени. Для применения непосредственно в ПЦР необходимо использовать 100× **ZUBR Green-1** для ПЦР-РВ (кат. номер 0010.2). Конечная концентрация красителя в ПЦР-смеси должна быть 1× (если при такой концентрации ПЦР ингибируется, то можно снизить концентрацию красителя до 0,5×). Помните, что содержание ДМСО в ПЦР смеси при концентрации красителя 1X составит 1%.

Хранение и безопасность.

Раствор **ZUBR Green-1** в ДМСО следует хранить при температуре –20°C в защищенном от света и влаги месте. Срок хранения красителя в этих условиях - не менее 1 года.

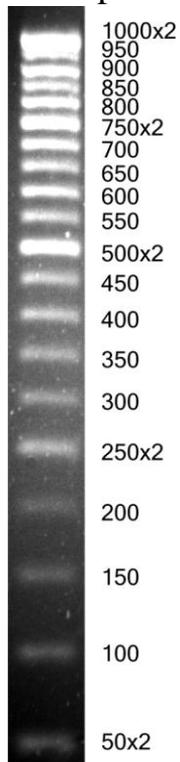
Несмотря на то, что мутагенная активность **ZUBR Green-1** значительно ниже, чем бромистого этидия [Singer *et al.*, Mutat. Res. 439: 37-47 (1999)], работать с красителем необходимо в перчатках с соблюдением всех строгих правил работы с опасными мутагенными веществами.

РЕАКТИВЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
ZUBR Green-1 (аналог SYBR Green I), 10 000× раствор в ДМСО, для прокраски гелей	000E.2	0,5 мл	1500
	000E.4	1 мл	2450
Буфер для загрузки образцов в гели, 6× (10 mM Трис-НСl, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол ФФ, 0,15% оранжевый Ж, 60% глицерин, 60 mM ЭДТА, pH 7,6)	0015.2	3 × 1 мл	ДОГ
Буфер для загрузки образцов в гели с ДСН, 6× Применяется для анализа образцов ДНК, содержащих большое количество ДНК-связывающих белков (гель электрофорез ДНК после рестрикции, лигирования или дефосфорилирования).	0014.2	2 × 1 мл	ДОГ
Перед загрузкой в лунки образец с буфером прогреть в течение 10 мин. при 65°C и охладить на льду. (0,03% ксиленцианол ФФ, 0,15% оранжевый Ж, 60% глицерин, 1% додецилсульфат натрия (SDS), 100 mM ЭДТА, pH 7,6)			
ТВЕ 10× буфер для электрофореза	0016.2	100 мл	ДОГ
ТАЕ 50× буфер для электрофореза	0017.2	100 мл	ДОГ
Агароза Предназначена для гель-электрофореза и блоттинга нуклеиновых кислот, а также гель-электрофореза белков	0032.2	50 г	ДОГ
ДНК маркер молекулярного веса, M50bp 25 фрагментов от 50 до 1000 н.п., Концентрация 0,2 мкг/мкл, рекомендуемый объём для нанесения в лунку – 2,5 мкл.	0047.2	0,25 мл	ДОГ
ДНК маркер молекулярного веса, M100bp 10 фрагментов от 100 до 1000 н.п., Концентрация 0,2 мкг/мкл, рекомендуемый объём для нанесения в лунку – 2,5 мкл.	0044.2	0,25 мл	ДОГ
ДНК маркер молекулярного веса, M1Kb 13 фрагментов от 0,25 до 10 т.н.п., Концентрация 0,2 мкг/мкл, рекомендуемый объём для нанесения в лунку – 2,5 мкл.	0045.2	0,25 мл	ДОГ

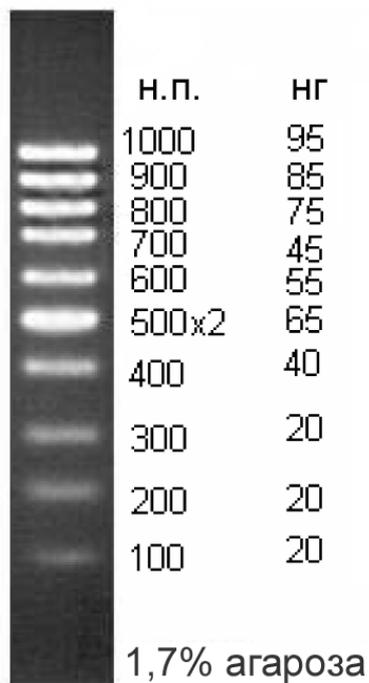
Электрофореграмма маркеров молекулярного веса ДНК.

M50bp

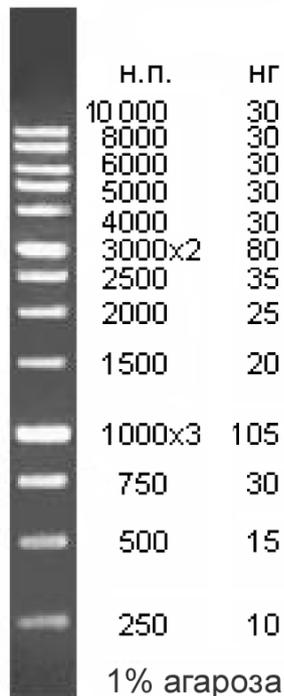


2,5% агароза
1xTAE

M100bp

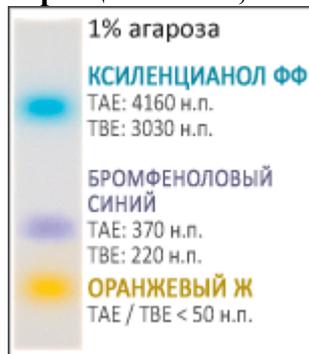


M1Kb



Фотография красителей в геле.

Буфер для загрузки образцов в гели, 6x



Буфер для загрузки образцов в гели с ДСН, 6x



НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
Набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб». Комплектация «А» Предназначен для выделения ДНК из образцов соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи, а также из образцов мочи.	005a.2	На 100 выделений	дог
Набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб». Комплектация «В» Предназначен для выделения ДНК из образцов цельной крови, плазмы, клеточного осадка мочи, слюны, ликвора, мокроты, биоптатов, бронхо-альвеолярного лаважа, промывных вод бронхов или фекалий.	005b.2	На 100 выделений	дог
Набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб». Комплектация «С» Предназначен для выделения ДНК из микро-биоптатов кожи, слизистых оболочек (мочеполовой системы, ЖКТ, бронхов) и паренхиматозных органов (пунктаты печени, селезенки), гомогенизированных тканей, а также из пищевых продуктов, биологических добавок, кормов для животных или растительного сырья.	005c.2	На 100 выделений	дог
Набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб». Комплектация «Г» Предназначен для выделения ДНК из геля или реакционной смеси. Фрагменты ДНК очищаются от олигонуклеотидов, нуклеотидов, избытка линкера, ферментов и солей, остатков фенола, хлороформа или красителей (бромистый этидий, бромфеноловый синий) и т.д. С помощью данного набора могут быть очищены фрагменты ДНК не менее 100 н.п.	005d.2	На 100 выделений	дог

ДРУГИЕ РЕАКТИВЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Наименование	Номер	Фасовка	Цена, руб
Протеиназа К (раствор 20 мг/мл, > 600 Ед./мл)	1808.2	1 мл	ДОГ
Деионизированная вода, обработанная диэтилпирокарбонатом (DEPC) Предназначена для работы с РНК. Не рекомендуется использовать в ПЦР или экспериментах <i>in vivo</i> .	0056.2	10 мл	ДОГ

Протокол 1.
Протокол постановки амплификации с использованием Quick-Load Taq 2X Master Mix

Данный протокол носит рекомендательный характер. Для получения наилучших результатов может потребоваться дополнительная оптимизация.

- Разморозьте 2X Master Mix при комнатной температуре или на льду. Перемешайте смесь, перевернув пробирку несколько раз.
- Смешайте компоненты для постановки ПЦР.

Компонент	На 25 мкл	На 50 мкл	Конечная концентрация
Quick-Load Taq 2X Master Mix	12,5 мкл	25 мкл	1X
Прямой праймер (10 мкМ)	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
Обратный праймер (10 мкМ)	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
ДНК матрица	Определяется пользователем	Определяется пользователем	< 500 нг
H ₂ O	Довести до 25 мкл	Довести до 50 мкл	

- Аккуратно смешайте и осадите центрифугированием. Если у амплификатора нет крышки с подогревом, добавьте каплю минерального масла.

Условия проведения ПЦР:

Начальная денатурация	95°C	30 секунд – 5 минут
20-45 циклов	95°C	15 – 30 секунд
	45°C – 70 °C	15 – 30 секунд
	72°C	1 минута на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	

Используя Quick-Load Taq 2X Master Mix вы можете наносить образцы после амплификации сразу же в лунки геля. Специальный краситель, добавленный в мастермикс, служит одновременно и краской для нанесения в гель, и маркером, показывающим перемещение ДНК в геле (краситель движется в 2%-ом агарозном геле приблизительно как двухцепочная ДНК длиной 320 п.н.).

Срок хранения 1 год при -20°C. Может быть разморожен-заморожен не менее 10 раз.

Протокол 2.
Протокол для рутинной амплификации с использованием Taq-ДНК-полимеразы.

Данный протокол носит рекомендательный характер. Для получения наилучших результатов может потребоваться дополнительная оптимизация.

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 50 мкл. Для проведения ПЦР в меньших объемах уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества компонентов. Минимальный рекомендуемый нами объем реакционной смеси – 10 мкл, оптимальный – 25 мкл.

- Приготовьте 50 мкл следующей смеси используя 0,2 или 0,5 мл пробирки. Все операции желательно проводить на льду.

Компонент	На 50 мкл	Конечная концентрация
Стандартный (10X) буфер, содержащий KCl или (NH ₄) ₂ SO ₄	5 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X – 2 мМ)	5 мкл	1X (200 мкМ)
MgCl ₂ (50 мМ)	1,5 – 3 мкл	1,5 – 3 мМ При меньшей концентрации MgCl ₂ повышается точность полимеразы, но уменьшается её процессивность.
Прямой праймер (10 мкМ)	0,5 – 2,5 мкл	5-25 пмоль
Обратный праймер (10 мкМ)	0,5 – 2,5 мкл	5-25 пмоль
ДНК матрица	Определяется пользователем	0,1-1 нг/мл плазмидной ДНК 1-10 мкг/мл геномной ДНК
Taq ДНК-полимераза (5 Ед./мкл)	0,2 мкл	0,02 Ед./мкл
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 50 мкл	

- Аккуратно смешайте и осадите центрифугированием. Если у амплификатора нет крышки с подогревом, добавьте каплю минерального масла.
- Условия проведения ПЦР

Начальная денатурация	95°C	30 секунд – 5 минут
20-30 циклов	95°C	15 – 30 секунд
	55°C – 65 °C	15 – 30 секунд
	72°C	1 минута на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

ПРИЛОЖЕНИЕ
Протокол 3.

Рутинная амплификации с использованием Tornado F ДНК-полимеразы (с детекцией продуктов амплификации с помощью геля электрофореза).

Данный протокол носит рекомендательный характер. Для получения наилучших результатов может потребоваться дополнительная оптимизация.

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 30 мкл. Для проведения ПЦР в меньших объемах уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества компонентов. Минимальный рекомендуемый нами объем реакционной смеси – 10 мкл.

1. Приготовьте 30 мкл следующей смеси используя 0,2 или 0,5 мл пробирки. Поскольку **Tornado** ДНК-полимераза обладает свойством «горячего старта» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	На 30 мкл	Конечная концентрация
2X T-buffer F*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X – 2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Обратный праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
ДНК матрица	Определяется пользователем	0,1-1 нг/мл плазмидной ДНК 1-10 мкг/мл геномной ДНК
Tornado ДНК-полимераза (2 Ед./мкл)	0,5 мкл	0,02 Ед./мкл
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 30 мкл	

*-2X T-buffer F содержит 3 мМ MgCl₂ (1X концентрация). Также в буфер входит желтый краситель (тартразин), облегчающий нанесение пробы в гель после ПЦР. Краситель мигрирует ниже фрагментов длиной 50 н.п. (в 1% агарозном геле), что позволяет вести электрофорез до полной элиминации красителя из геля.

2. Аккуратно смешайте и осадите центрифугированием. Если у амплификатора нет крышки с подогревом, добавьте каплю минерального масла.
3. Условия проведения ПЦР

ВНИМАНИЕ! Четко соблюдайте рекомендованные условия амплификации!

Изменение температуры денатурации на более низкую может привести к существенному ухудшению амплификации.

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	93°C	15 минут
20-35 циклов	99°C	1 секунда
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	15-30 секунд на 1 000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

*Температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотида с меньшим ее значением. **ВНИМАНИЕ!!!** Температуры плавления олигонуклеотидов должны рассчитываться с применением программ, использующих алгоритм «ближайших соседей» (*nearest neighbor*), например **Oligo Calculator 3.24** (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>), **Primer 3**, **Oligo 7**.

** Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 2500 н.п.

После окончания амплификации нанесите 5-10 мкл ПЦР-смеси в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.

Протокол 4.

ПЦР с использованием цельной крови стабилизированной ЭДТА с помощью Tornado В ДНК-полимеразы.

Данный протокол носит рекомендательный характер. Для получения наилучших результатов может потребоваться дополнительная оптимизация.

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны

В настоящее время способность **Tornado** ДНК-полимеразы использовать в качестве матрицы цельную кровь тестировалась только на образцах крови, стабилизированных ЭДТА.

1. Кровь в количестве 1 мл собрать в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта).
2. Приготовьте 30 мкл следующей смеси используя 0,2 или 0,5 мл пробирки. Поскольку **Tornado** ДНК-полимераза обладает свойством «горячего старта» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	На 30 мкл	Конечная концентрация
2X T-buffer В*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X – 2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Обратный праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Кровь, стабилизированная ЭДТА**	0,3 – 6 мкл	1 – 20%
Tornado ДНК-полимераза (2 Ед./мкл)	0,5 мкл	0,02 Ед./мкл
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 30 мкл	

*-2X T-buffer В содержит 3,5 мМ MgCl₂ (1X концентрация). Данная концентрация MgCl₂ позволяет проводить ПЦР с использованием 1-10% цельной крови. Внесение большего процента крови может потребовать коррекции концентрации MgCl₂.

**При внесении в пробу крови (1-10%) содержимое пробирки можно перемешать для полного ресуспендирования крови, что улучшит количество экстрагируемой ДНК. При внесении в пробу крови (10-20%), содержимое пробирки желательно не перемешивать и позволить осадку крови оставаться на дне пробирки. Количество вносимой в ПЦР крови подбирается эмпирически для каждой конкретной пары олигонуклеотидов.

3. Если у амплификатора нет крышки с подогревом, добавьте каплю минерального масла.
4. Условия проведения ПЦР

ВНИМАНИЕ! Четко соблюдайте рекомендованные условия амплификации!

Изменение температуры денатурации на более низкую может привести к существенному ухудшению амплификации.

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	93°C	15 минут
20-35 циклов	99°C	1 секунда
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	15-30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

*Температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотида с меньшим ее значением. **ВНИМАНИЕ!!!** Температуры плавления олигонуклеотидов должны рассчитываться с применением программ, использующих алгоритм «ближайших соседей» (*nearest neighbor*), например **Oligo Calculator 3.24** (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>), **Primer 3**, **Oligo 7**.

** Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 2500 н.п.

5. После окончания амплификации центрифугируйте содержимое пробирки (в случае если осадок крови был ресуспендирован) 5 мин при ≥1 000 g. Супернатант (5-10 мкл) нанесите в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.
6. В случае проведения рестрикционного анализа отберите 10 мкл супернатанта и внесите туда 0,5 – 10 Ед. необходимой рестрикционной эндонуклеазы. Инкубируйте 1 ч. при температуре, указанной производителем фермента. После этого нанесите смесь в лунку агарозного геля и проведите электрофорез. Если рестрикционная эндонуклеаза не работает в ПЦР буфере, можно развести пробу в 2-3 раза дистиллированной водой.

Протокол 5.
ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием Tornado S ДНК-полимеразы и интеркалирующим красителем Зубр 1 (Sybr Green I).

Данный протокол носит рекомендательный характер. Для получения наилучших результатов может потребоваться дополнительная оптимизация.

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 30 мкл. Для проведения ПЦР в меньших объемах уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества компонентов. Минимальный рекомендуемый нами объем реакционной смеси – 10 мкл.

1. Приготовьте 30 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки. Поскольку **Tornado** ДНК-полимераза обладает свойством «горячего старта» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	На 30 мкл	Конечная концентрация
2X T-buffer S*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X – 2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Обратный праймер (10 мкМ)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
ДНК матрица	Определяется пользователем	0,1-1 нг/мл плазмидной ДНК 1-10 мкг/мл геномной ДНК
Sybr Green I (100X)**	0,15 мкл	0,5X
Tornado ДНК-полимераза (2 Ед./мкл)	0,5 мкл	0,02 Ед./мкл
H ₂ O	Довести реакционную смесь до 30 мкл	

*-2X T-buffer S содержит 3 мМ MgCl₂ (1X концентрация). Данный буфер не содержит детергентов, что существенно снижает образование пены при пипетировании и улучшает результаты.

** При использовании **Sybr Green I** его концентрация может быть увеличена вплоть до 1X. Мы предлагаем провести серию Real Time амплификаций с известной матрицей и разными концентрациями **Sybr Green I** (0,5X-0,8X-1X-1,2X-1,5X) и выбрать ту, при которой не происходит сдвига C_t вправо по сравнению с меньшими концентрациями **Sybr Green I**.

4. Аккуратно смешайте и осадите центрифугированием.
5. Условия проведения ПЦР

ВНИМАНИЕ! Четко соблюдайте рекомендованные условия амплификации!

Изменение температуры денатурации на более низкую может привести к существенному ухудшению амплификации.

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	93°C	15 минут	
20-35 циклов	99°C	1 секунда	Детекция продукта ПЦР
	60 °C	15 секунд	
Анализ кривых плавления	Определяется пользователем в зависимости от используемого прибора.		

Условия хранения:

Буфер для хранения **Tornado** ДНК-полимеразы: 10 мМ Hepes-KOH (pH 8,0); 100 мМ KCl; 1 мМ DTT; 0,5 % Тритон X-100; 0,5% NP-40; 50% глицерин.

Хранить при -20°C.