

## Silver Hot Start DNA Polymerase

### Silver Hot Start DNA Polymerase PLUS

### Silver Hot Start PCR MIX

### Silver Hot Start PCR MIX LOAD

#### Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Silver Hot Start DNA Polymerase	SY550411	SY550412
Silver Hot Start (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Silver Hot Start	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml

Silver Hot Start DNA Polymerase PLUS	SY550411P	SY550412P
Silver Hot Start (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Silver Hot Start	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
10 mM dNTP Mix	1 ml	1 ml

Silver Hot Start PCR MIX	SY550431
5 x Silver Hot Start MIX	250 rx 1 ml

Silver Hot Start PCR MIX LOAD	SY550441
5 x Silver Hot Start MIX LOAD	250 rx 1 ml

Transport produktów Silver Hot Start przebiega w temperaturze pokojowej, a przechowywanie w temperaturze -20°C

#### Opis komponentów

Silver Hot Start DNA Polymerase to rekombinowana termostabilna polimeraza Taq o masie cząsteczkowej 95 kDa pochodząca z *Thermus aquaticus*, syntetyzowana w *E.coli*. 1 U enzymu katalizuje przyłączenie 10 nmoli dNTP do powstającej nici DNA w kierunku od 5' do 3' w czasie 30 minut w temperaturze 74°C. Enzym posiada dodatkowo zależną od polimeryzacji aktywność egzonukleazową w kierunku od 5' do 3', brak jest natomiast aktywności egzonukleazowej w kierunku od 3' do 5'. Silver Hot Start DNA Polymerase dodaje do amplifikowanych fragmentów zakończenie poli-A, dzięki czemu nadają się one do bezpośredniego klonowania TA lub oczyszczania opartego o sondy oligo-dT. Enzym utrzymuje formę płynną w temperaturze -20°C dzięki buforowi do przechowywania zawierającemu 50% glicerol, Tris-HCl, KCl i EDTA.

Polimeraza Silver Hot Start jest inaktywowana poprzez unikalną modyfikację chemiczną miejsca aktywnego, dzięki czemu wykazuje całkowitą nieaktywność w temperaturze pokojowej przed procesem standardowej aktywacji termicznej. Do inaktywacji polimerazy nie są stosowane kapsułki woskowe ani przeciwiata. Aktywacja enzymu następuje poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 15 minut przed pierwszym cyklem. Okres połowicznej utraty aktywności w temperaturze 95°C wynosi 1,5h.

Bufor reakcyjny Silver tworzy idealne środowisko pracy polimerazy. Jego unikalna kompozycja została oparta na

Tris-HCl oraz (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, co optymalizuje przebieg reakcji i znacznie zwiększa specyficzność amplifikacji. Współczynnik występowania błędów wynosi poniżej 2,5 x 10<sup>-5</sup> na nukleotyd na cykl. Bufor reakcyjny Silver nie zawiera magnezu, dzięki czemu można go łatwo zastąpić np. manganem. 25 mM MgCl<sub>2</sub> dostarczany jest w osobnej probówce.

Zestaw Silver Hot Start DNA Polymerase PLUS zawiera dodatkową probówkę z gotowym do użycia miksem dNTP w stężeniu 10 mM.

Silver Hot Start PCR MIX to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Silver Hot Start oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. W skład miksu poza polimerazą wchodzi bufor reakcyjny Silver, MgCl<sub>2</sub> w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy, BSA.

Silver Hot Start PCR MIX LOAD to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Silver Hot Start oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. W skład miksu poza polimerazą wchodzi bufor reakcyjny Silver, MgCl<sub>2</sub> w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy, BSA, obciążnik ułatwiający nakładanie próbek na żel oraz dwa barwniki migrujące w żelu – niebieski przy ok. 4 kb i żółty przy ok. 40 bp (migracja barwników uzależniona jest od stężenia agarozy). Próbki po reakcji PCR należy nakładać bezpośrednio na żel agarozowy, bez dodatkowego buforu obciążnikowego.

#### Procedura

##### Silver Hot Start DNA Polymerase Silver Hot Start DNA Polymerase PLUS

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

1. Wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić, zworteksować i zwirować.
2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA. Mastermiks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

Składnik mastermiksu	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
Silver Hot Start (5 U/ul)	0,2 ul	1U
10x Bufor Silver Hot Start	2 ul	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2-2 ul	1,5-2,5 mM
10 mM dNTP Mix	0,4 ul	200 uM
10 uM Primer F	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
10 uM Primer R	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	< 10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
<b>Objętość reakcji</b>	<b>20 ul</b>	<b>-</b>

- Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
- Rozpipetować mastermiks do próbek reakcyjnych.
- Dodać matrycowe DNA do każdej próbki i wymieszać pipetując.  
Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
- Umieścić szczelnie zamknięte próbki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	30-60 sek.	
Annealing	50-68°C	30-60 sek.	25-35 cykli
Elongacja	72°C	1-4 min.	
Końcowa elongacja	72°C	5-10 min.	
Schłodzenie	4-10°C	∞	

- W termocyklerze włączyć pokrywę grzejącą na temperaturę >95°C. W termocyklerach nieposiadających pokrywy grzejnej próbki należy pokryć olejem mineralnym.

#### Silver Hot Start PCR MIX Silver Hot Start PCR MIX LOAD

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

- Miks należy całkowicie rozmrozić, zworteksować i zwirować.
- Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA. Miks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

Składnik mastermiksu	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
5 x Silver Hot Start PCR MIX	4 ul	1x
10 uM Primer F	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
10 uM Primer R	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	< 10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
<b>Objętość reakcji</b>	<b>20 ul</b>	-

- Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
- Rozpipetować mastermiks do próbek reakcyjnych.
- Dodać matrycowe DNA do każdej próbki i wymieszać pipetując.  
Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
- Umieścić szczelnie zamknięte próbki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-

minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela.

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	10-20 sek.	
Annealing	50-68°C	30-60 sek.	25-35 cykli
Elongacja	72°C	20 s.-4 min.	
Końcowa elongacja	72°C	5-10 min.	
Schłodzenie	4-10°C	∞	

- W termocyklerze włączyć pokrywę grzejącą na temperaturę >95°C. W termocyklerach nieposiadających pokrywy grzejnej próbki należy pokryć olejem mineralnym.

#### Dalsze procedury

Próbki po reakcji można przechowywać do 8h w temperaturze +4°C (wliczając w ten okres czas inkubacji w temp. 4-10°C w termocyklerze) lub zamrozić w -20°C w celu dłuższego przechowywania.

W celu analizy elektroforetycznej próbki po reakcji należy obciążyć poprzez wymieszanie z koncentratem buforu obciążnikowego (np. 6x Syngen Blue Loading Dye SY521051, 6x Syngen Orange Loading Dye SY521061) i nakładać na żel agarozowy. [Nie dotyczy Silver Hot Start PCR MIX LOAD]

Do izolacji prążków z żelu agarozowego można zastosować zestawy kolumienkowe (np. Syngen Gel Mini Kit SY201210, Syngen Gel ME Mini Kit SY201410).

Produkty PCR nadają się do bezpośredniego oczyszczania przy pomocy zestawów kolumienkowych (np. Syngen PCR Mini Kit, SY 101110, Syngen PCR ME Mini Kit SY201310) oraz poprzez rozdział w agarozie low melting (np. Syngen Low Melting Agarose SY521013). [Nie dotyczy Silver Hot Start PCR MIX LOAD]

#### Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.  
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13  
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33  
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl

