

Silver Taq DNA Polymerase

Silver Taq DNA Polymerase PLUS

Silver Taq PCR MIX

Silver Taq PCR MIX LOAD

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Silver Taq DNA Polymerase	SY550311	SY550312
Silver Taq (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Silver	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl ₂	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml

Silver Taq DNA Polymerase PLUS	SY550311P	SY550312P
Silver Taq (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Silver	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl ₂	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
10 mM dNTP Mix	1 ml	1 ml

Silver Taq PCR MIX	SY550331
5 x Silver Taq MIX	250 rx 1 ml

Silver Taq PCR MIX LOAD	SY550341
5 x Silver Taq MIX LOAD	250 rx 1 ml

Transport produktów Silver przebiega w temperaturze pokojowej, a przechowywanie – w temperaturze -20°C.

Opis komponentów

Silver Taq 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 Taq 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.

Bufor reakcyjny Silver tworzy idealne środowisko pracy polimerazy. Jego unikalna kompozycja została oparta na Tris-HCl oraz (NH₄)₂SO₄, co optymalizuje przebieg reakcji i znacznie zwiększa specyficzność amplifikacji. Współczynnik występowania błędów wynosi poniżej 2,5 x 10⁻⁵ na nukleotyd na cykl. Bufor reakcyjny Silver nie zawiera magnezu, dzięki czemu można go łatwo zastąpić np. manganem. 25 mM MgCl₂ dostarczany jest w osobnej probówce.

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

Silver Taq PCR MIX to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Silver Taq oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. W skład miksu poza polimerazą wchodzi bufor reakcyjny Silver, MgCl₂ w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy.

Silver Taq PCR MIX LOAD to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Silver Taq oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. W skład miksu poza polimerazą wchodzi bufor reakcyjny Silver, MgCl₂ w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy, 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.

Procedury dla:

Silver Taq DNA Polymerase Silver Taq DNA Polymerase PLUS

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

1. Wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić (o ile przechowywano je w -20°C), 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 Taq (5 U/ul)	0,2 ul	1 U
10x Bufor Silver	2 ul	1x
25 mM MgCl ₂	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	-
Objętość reakcji	20 ul	-

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do probówek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej probówki i wymieszać pipetując. Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie zalecamy przekraczania 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte probówki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję ze wstępną denaturacją. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Wstępna denaturacja	95°C	3-5 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	∞	

* Czas elongacji zależy od długości produktu. Przyjmuje się około 1 min./1 kb.

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

Procedury dla:

Silver Taq PCR MIX

Silver Taq PCR MIX LOAD

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

1. Miks należy całkowicie rozmrozić (o ile przechowywano go w -20°C), zworteksować i zwirować.
2. 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 mastermiks	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
5 x Silver Taq 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	-
Objętość reakcji	20 ul	-

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do próbek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej próbki i wymieszać pipetując.
Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie zalecamy przekraczania 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte próbki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję ze wstępną denaturacją. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela.

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Wstępna denaturacja	95°C	3-5 min.	
Denaturacja	95°C	20-40 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	∞	

* Czas elongacji zależy od długości produktu. Przyjmuje się około 1 min./1 kb.

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

Dalsze procedury

Silver Taq DNA Polymerase

Silver Taq DNA Polymerase PLUS

Silver Taq PCR MIX

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.

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).

Silver Taq PCR MIX LOAD

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 nakładać bezpośrednio na żel bez dodatkowego obciążania.

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

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

