

Tornado Taq-полимераза (hot-start)

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

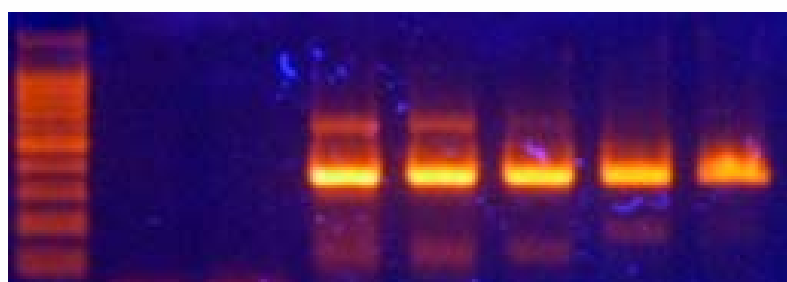
Основное предназначение:

- 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, Зубр I).
- 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 Зубр I.** Обычная Taq-полимераза ингибируется **Зубр I** в концентрациях превышающих 0,15X, в то время как **Tornado Taq** выдерживает **Зубр I** вплоть до концентрации 0,6X.

К- К- К+ 1% 3% 6% 10%

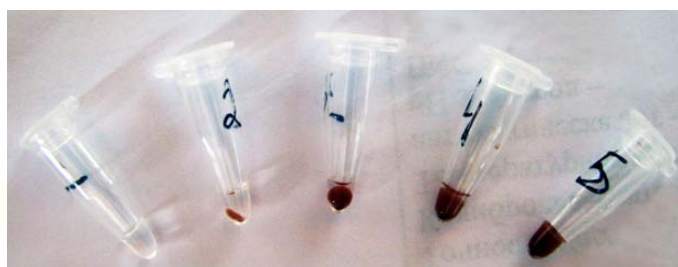


← 360 н.п.

К- - отрицательный контроль

К+ - положительный контроль с использованием 10 нг очищенной ДНК

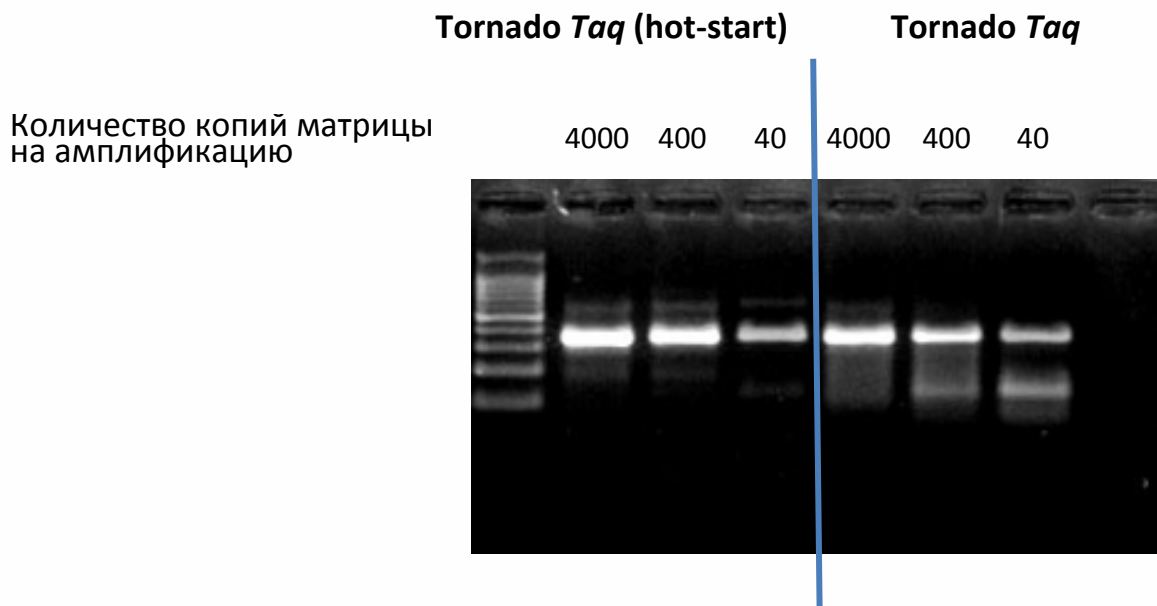
1%-10% - процент (об/об) содержание цельной крови в ПЦР



К+ 1% 3% 6% 10%

*Поскольку у **Tornado Taq** отсутствует 5'→3'-экзонуклеазная активность, данный фермент нельзя применять в ПЦР с зондами Taqman

Применение технологии "hot-start" улучшает чувствительность и специфичность амплификации.

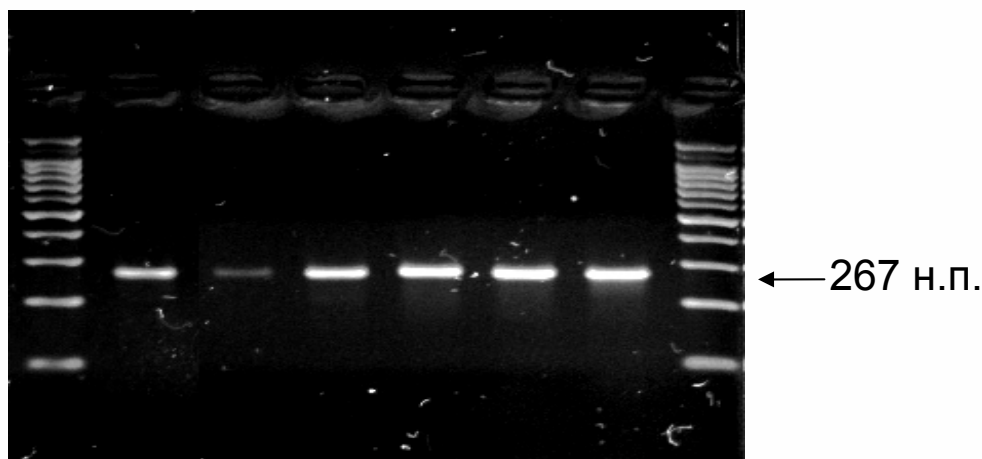


Амплификацию проводили с использованием праймеров к геномной ДНК человека.

Применение Tornado Taq для детекции точечной мутации фактора V системы свертываемости крови (G20210A) методом RFLP

Аmplификация участка гена, содержащего точечную мутацию с использованием цельной крови

К+ 1% 5% 10% 15% 20%



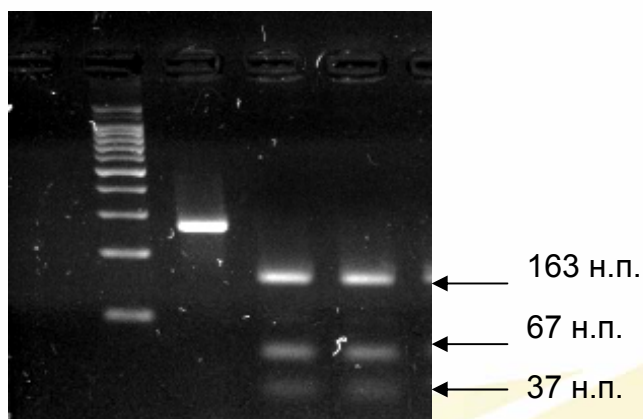
К- - отрицательный контроль

К+ - положительный контроль с использованием 10 нг очищенной ДНК

1%-20% - процент (об/об) содержание цельной крови в ПЦР

Обработка ПЦР смеси (10 мкл) рестрикционной эндонуклеазой Mnl I

К 1 2



1-2 рестрикционный анализ ДНК двух пациентов.

Протокол 1. Рутинная амплификации с использованием Tornado Taq-полимеразы (с детекцией продуктов амплификации с помощью геля электрофореза).

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Протокол

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 30 мкл. Можно также проводить ПЦР и в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества. Минимальный рекомендуемый нами объем реакционной смеси - 10 мкл.

1. Приготовьте 30 мкл следующей смеси используя 0,2 или 0,5 мл пробирки. Поскольку **Tornado Taq** обладает «горячим стартом» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
2X T-buffer F*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X-2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 пмоль/мкл)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пМ
Обратный праймер (10 пмоль/мкл)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пМ
ДНК матрица	Определяется пользователем	0,1-1 нг/мл плазмидной ДНК 1-10 мкг/мл геномной ДНК
Tornado Taq (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, облегчающий нанесение пробы после ПЦР на гель. Краситель мигрирует ниже фрагментов длиной 20 н.п., что позволяет вести электрофорез до его полной элиминации из геля.**

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте. 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.

Мы рекомендуем две различные схемы амплификации, которые зависят от используемого амплификатора и тестируются при начале работы с Tornado Taq™.

ОСНОВНАЯ СХЕМА

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	99°C	1 секунда
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ СХЕМА (Для амплификаторов с быстрой скоростью нагрева-охлаждения ~10°C/сек)

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	98°C	10 секунд
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

***Температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотида (T_m) с меньшим ее значением. ВНИМАНИЕ!!! T_m олигонуклеотидов должны рассчитывается с применением программ, использующих алгоритм *nearest neighbor*, например Oligo Calculator version 3.25 (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>).**

**** Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 2 500 н.п.**

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

Протокол 2. ПЦР с использованием цельной крови стабилизированной ЭДТА с помощью Tornado Taq полимеразы.

В настоящее время способность Tornado Taq 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 (0,05 М 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 Taq** обладает «горячим стартом» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
2X T-buffer В*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X-2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 пмоль/мкл)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Обратный праймер (10 пмоль/мкл)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Кровь, стабилизированная ЭДТА**	0,3 – 6 мкл	1 – 20%
Tornado Taq (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.

Условия проведения ПЦР:

ВНИМАНИЕ! Четко соблюдайте рекомендованные условия амплификации!

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

Мы рекомендуем две различные схемы амплификации, которые зависят от используемого амплификатора и тестируются при начале работы с Tornado *Taq*.

ОСНОВНАЯ СХЕМА

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	99°C	1 секунда
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ СХЕМА (Для амплификаторов с быстрой скоростью нагрева-охлаждения ~10°C/сек)

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	98°C	10 секунд
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C**	30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

***Температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотида (T_m) с меньшим ее значением. ВНИМАНИЕ!!! T_m олигонуклеотидов должны рассчитываться с применением программ, использующих алгоритм *nearest neighbor*, например Oligo Calculator version 3.25 (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>).**

**** Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 2 500 н.п.**

4. После окончания амплификации отцентрифугируйте пробирки (в случае если осадок крови был ресуспендирован) 5 мин при $\geq 1\ 000\ g$. Супернатант (5-10 мкл) нанесите в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.

5. В случае проведения рестрикционного анализа отберите 10 мкл супернатанта и внесите туда 0,5 – 10 ед. необходимой рестрикционной эндонуклеазы. Инкубируйте 1 час при температуре, указанной производителем фермента. После этого нанесите смесь на агарозный гель-электрофорез. Если рестрикционная эндонуклеаза не работает в ПЦР буфере, можно развести пробу в 2-3 раза дистиллированной водой.

Протокол 3. Real-time ПЦР с использованием Tornado Taq полимеразы и интеркалирующим красителем Зубр I.

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть хорошо перемешаны.

Протокол

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 30 мкл. Можно также проводить ПЦР и в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества. Минимальный рекомендуемый нами объем реакционной смеси - 10 мкл.

4. Приготовьте 30 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки. Поскольку **Tornado Taq** обладает «горячим стартом» все этапы смешивания можно проводить при комнатной температуре.

Компонент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
2X T-buffer S*	15 мкл	1X
Смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10X-2 мМ)	3 мкл	1X (200 мкМ)
Прямой праймер (10 пмоль/ мкл)	0,25 – 2,5 мкл	2,5 -25 пмоль
Обратный праймер (10 пмоль/ мкл)	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
Зубр I (100X)**	0,15 мкл	0,5X
Tornado Taq (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 I его концентрация может быть увеличена вплоть до 1X. Мы предлагаем провести серию Real Time амплификаций с известной матрицей и разными концентрациями Sybr 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 I.**

5. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.
6. Условия проведения ПЦР

ВНИМАНИЕ! Четко соблюдайте рекомендованные условия амплификации!

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

Мы рекомендуем две различные схемы амплификации, которые зависят от используемого амплификатора и тестируются при начале работы с Tornado Taq.

ОСНОВНАЯ СХЕМА

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	99°C	1 секунда
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C (считывание сигнала)	30 секунд на 1000 пар оснований
Хранение	4°C	∞

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ СХЕМА (Для амплификаторов с быстрой скоростью нагрева-охлаждения ~10°C/сек)

Начальная денатурация. В течение данного цикла происходит активация фермента	95°C	15 минут
20-35 циклов	98°C	10 секунд
	55°C – 68 °C*	5-15 секунд
	72°C (считывание сигнала)	30 секунд на 1000 пар оснований
Финальная элонгация	72°C	2 минуты
Хранение	4°C	∞

***Температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотида (T_m) с меньшим ее значением. ВНИМАНИЕ!!! T_m олигонуклеотидов должны рассчитывается с применением программ, использующих алгоритм *nearest neighbor*, например Oligo Calculator version 3.25 (<http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>).**

**Условия хранения:
-20°C.**

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