

Информация о продукте

Ф полимеразы

ТУ 9398-314-98539446-2016

Для исследовательских работ *in vitro*

Кат. №	Количество е.а.	Состав
F-полимераза		
768-01	100 е.а.	F полимеразы (2 е.а./мкл), 50 мкл; 5x буфер HF для F полимеразы, 1500 мкл; 5x буфер GC для F полимеразы, 1500 мкл. Раствор MgCl ₂ (25 мМ), 500 мкл;
768-02	500 е.а.	F полимеразы (2 е.а./мкл), 250 мкл; 5x буфер HF для F полимеразы, 2x1500 мкл; 5x буфер GC для F полимеразы, 2x1500 мкл. Раствор MgCl ₂ (25 мМ), 500 мкл;

Описание:

F полимеразы является термостабильной высокопроцессивной и высокоточной ДНК полимеразой.

F полимеразы обеспечивает высокий выход продуктов амплификации с разнообразных ДНК-матриц, позволяет амплифицировать фрагменты более 10000 bp, подходит для введения мутаций, безлигазного клонирования генов и библиотек генов.

Области применения:

- Высокоточная ПЦР;
- ПЦР длинных фрагментов (>10 kbp);
- «Digest-ПЦР» с использованием в качестве матрицы ЭДТА-стабилизированной крови (до 15%)

Характеристики фермента:

- проявляет 5'→3' полимеразную активность;
- обладает корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активностью, обеспечивающей высокую точность амплификации (в 50 раз точнее Taq полимеразы).
- 5'→3' экзонуклеазная активность отсутствует
- Скорость работы фермента в 10 раз превышает скорость работы Pfu полимеразы, соответственно, время элонгации может быть снижено до 15-30 сек (в зависимости от сложности матрицы) на 1 kbp.
- Дает высокий выход продуктов амплификации
- Устойчив к присутствию ингибиторов: до 15% цельной крови можно добавлять напрямую в ПЦР.
- позволяет получать фрагменты ДНК с «тупыми» концами, т.е. не подходит для А/Т клонирования
- Не имеет горячего старта.

Описание ПЦР-буферов:

5x буфер HF и 5x буфер GC для F полимеразы содержат 10 мМ MgCl₂, что обеспечивает оптимальную финальную концентрацию MgCl₂ - 2 мМ - в реакционной смеси. В большинстве случаев для проведения высокоточной ПЦР рекомендуется использовать буфер HF для F полимеразы. Буфер GC для F полимеразы применяют при проведении ПЦР на длинных матрицах со сложной вторичной структурой и высоким содержанием GC-пар.

Единица активности:

За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотно-нерастворимую фракцию за 30 минут при +74°C.

Буфер для хранения/разведения F полимеразы:

20 мМ Трис (рН 8,0); 100 мМ хлорид калия; 0,1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТТ; 50 % глицерин; 1 % Твин 20.

Рекомендации для проведения ПЦР

- Все растворы после размораживания тщательно перемешать и осадить капли центрифугированием;
- На льду
 - приготовить стоковую смесь, состоящую из воды, буфера, трифосфатов нуклеотидов, праймеров и F полимеразы согласно таблице 1. Не рекомендуется использовать больше 0,04 е.а. полимеразы в расчете на 1 мкл реакционной смеси, особенно при синтезе фрагментов ДНК длиной > 5 тысяч пар нуклеотидов
 - разлить по индивидуальным пробиркам.
 - Добавить ДНК-матрицу на стенку.
- В качестве альтернативы приготовлению реакционных смесей на льду можно использовать физический горячий старт – разделение компонентов реакционной смеси за счет парафиновой пробки.
- Перемешать реакционные смеси, осадить капли центрифугированием.
- Провести ПЦР согласно протоколу (таблица 2).

Протокол приготовления реакционной смеси

Таблица 1

Компонент	Концентрация в 1х реакционной смеси
5х буфер HF для F полимеразы/ 5х буфер GC для F полимеразы	1X
dNTPs	200 мкМ
Прямой праймер	0.5 мкМ
Обратный праймер	0.5 мкМ
ДНК-матрица	< 250 нг
F полимеразы	0,02-0,08 е.а./мкл

Протокол амплификации

Таблица 2

Шаг	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
начальная денатурация	98	30 сек	1
Денатурация	98	5-10 сек	25-35
Отжиг	55-67*	5-15 сек	
Элонгация	72	15-30 сек/kbp**	
Финальная элонгация	72	5 мин	1
Хранение	4	∞	-

*Оптимальная температура отжига может быть рассчитана следующим образом: Tm праймеров + 5°С

** Длина амплифицируемого фрагмента может превышать 10 kbp. Для несложных матриц (плазмиды, ДНК фагов и ВАС клоны) время элонгации может быть снижено до 15сек на 1 kbp. Для сложных матриц (геномная ДНК человека) рекомендуемое время элонгации – 30 сек на 1 kbp.

Условия транспортировки:

Выдерживает транспортировку с использованием хладагентов при 0 ... -20°С в течение 7-ми суток.

Условия хранения: хранить при -18 ... -30°С.

Срок годности: 2 года.