Tersus полимераза

Кат. ## PK123S, PK123L

Версия 4 от 7 мая 2025 г.

Tersus полимераза — смесь термостабильных ДНК-полимераз с «горячим стартом» для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц.
Tersus полимераза комплектуется Tersus Plus буфером, увеличивающим эффективность ПЦР.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	PK123S 200 реакций	PK123L 1 000 реакций
50X Tersus polymerase mix	100 мкл	600 мкл
10X Tersus Plus buffer	500 мкл (5 x 100 мкл)	3 мл (5 x 600 мкл)

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °C.
Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Область применения

- Амплификация фрагментов ДНК для переклонирования.
- Сайт-направленный мутагенез.
- Амплификации ДНК-фрагментов для дальнейшего секвенирования.
- Высокоспецифичная ПЦР со сложных ДНК матриц.
- ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями (SYBR Green I и др.).

Основные характеристики

- Высокая точность синтеза.
- 5´→3´ ДНК-полимеразная активность (до 10 т.п.о.).
- Отсутствие 5´→3´ экзонуклеазной активности.
- Корректирующая 3´→5´ экзонуклеазная активность.
- Быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (95 °C, 5–10 с).
- Высокая специфичность амплификации.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор.

Приготовление реакционной смеси

В стерильной пробирке для ПЦР приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже. При отсутствии нагревающейся крышки в амплификаторе, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Для амплификации ДНК богатой GC-участками (>65% GC) рекомендуется добавлять DMSO (2–5%) и/или бетаин (до концентрации 0.5–2M в реакционной смеси).

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
10X Tersus Plus буфер*	2.5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	1X (0.2 мМ каждого)
ПЦР праймер 1	переменное	0.2–0.5 мкМ
ПЦР праймер 2	переменное	0.2–0.5 мкМ
ДНК-матрица	переменное	1–200 нг на реакцию
50X Tersus полимераза	0.5 мкл	1X
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	—

* При обнаружении осадка в 10X Tersus Plus buffer, прогрейте буфер при +37 °C до полного растворения осадка.

Параметры ПЦР

Для амплификации большинства матриц размером от 50 п.о. до 10 т.п.о. воспользуйтесь предложенными ниже параметрами и рекомендациями по режиму амплификации. Окончательная оптимизация условий амплификации должна проводиться пользователем индивидуально для каждого эксперимента.

Предварительная денатурация	92–95 °C	1–3 мин
Циклы ПЦР (оптимизировать)	92–95 °C	5 с – 1 мин
	Tm* (55–68 °C)	5 с – 1 мин
	72 °C	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	72 °C	2–10 мин

* Tm – температура отжига праймера.

** Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК).

Рекомендации по режиму амплификации

- Предварительная денатурация в течение 2–3 мин рекомендуется для геномной ДНК. В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0.5–1 мин.
- Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьируется от 55 до 68 °C . Для приблизительного расчета температуры отжига (Tm) можно воспользоваться формулой:

  $$Tm\ (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

  Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов (Tm + 5 °C) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.
- Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на 1–1.5 т.п.о.). Для увеличения выхода ПЦР-продукта используйте финальную достройку цепи на последнем цикле ПЦР в течение 2–3 мин.
- Рекомендуется по возможности минимизировать количество циклов ПЦР, так как избыточное их количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.

- Для работы со сложными для амплификации фрагментами, например, с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC). При этом следует внести следующие изменения в стандартную программу ПЦР:
  - увеличить продолжительность предварительной денатурации до 5 мин;
  - увеличить температуру денатурации до 98 °C;
  - увеличить количество циклов ПЦР на 2–7;
  - добавить в реакционную смесь DMSO и/или бетаин.

▶ *Добавление в реакционную смесь DMSO и бетаина влияет на специфичность и температуру плавления. Рекомендуется оптимизировать количество DMSO и бетаина в реакции.*

Клонирование ПЦР-продуктов в TA-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в pAL2-T вектор (например, кат. # TA002, Евроген) благодаря выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам. Для клонирования нужно использовать свежеприготовленный ПЦР продукт. Сразу после окончания амплификации пробирку с продуктом ПЦР следует поместить в лед. Так как использование неочищенного ПЦР продукта сильно снижает эффективность клонирования, рекомендуется провести очистку ДНК на колонке или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением. В реакцию лигирования рекомендуется взять 100–200 нг ДНК.

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru