

## Епсусло полимераза

Епсусло полимераза представляет собой специально разработанную смесь термостабильных ДНК полимераз для эффективной амплификации фрагментов ДНК длиной до 20 т.п.о. с широкого спектра матриц.

### Область применения

- амплификация длинных фрагментов (до 20 т.п.о.)
- амплификация сложных смесей ДНК, образцов тотальной кДНК
- ПЦР с малых количеств ДНК
- амплификация низкокопийных последовательностей со сложных матриц (геномная ДНК, первая цепь кДНК и т.п.)
- ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями (SYBR Green и др.)

Кат. #	Кол-во	Состав
PK002S	200 р-ций объемом 25 мкл	50X смесь полимераз Епсусло, 100 мкл; 10X Епсусло буфер, 600 мкл
PK002L	1000 р-ций объемом 25 мкл	50X смесь полимераз Епсусло, 5x100 мкл; 10X Епсусло буфер, 5x600 мкл

Хранение и транспортировка: -20°C.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

### Основные свойства Епсусло полимеразы:

- высокопроцессивная 5'>3' ДНК-полимеразная активность
- корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность
- отсутствие 5'>3' экзонуклеазной активности
- быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95°C)
- высокая специфичность амплификации
- высокий выход продукта ПЦР
- возможность клонирования продуктов ПЦР в ТА-вектор (TA-cloning)

## Приготовление реакционной смеси

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

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
Стерильная вода	до 25 мкл	-
10X Епсусло буфер	2.5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	1X (0.2 mM 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 Епсусло полимеразы	0.5 мкл	1X

**Епсусло полимеразы** неактивна при комнатной температуре. Фермент "активируется" после прогревания реакционной смеси в первом цикле денатурации.

**Епсусло буфер** необходим для оптимальной работы Епсусло полимеразы. Использование буфера другого состава может привести к существенному падению эффективности ПЦР.

## Параметры ПЦР

Для амплификации большинства матриц размером от 50 п.о. до 7 т.п.о. воспользуйтесь предложенными ниже параметрами и рекомендациями по режиму амплификации. Окончательная оптимизация условий амплификации должна проводиться пользователем индивидуально для каждого эксперимента.

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	92-95°C	1 - 3 мин
Денатурация		92-95°C	5 сек - 1 мин
Отжиг	10-38	T <sub>m</sub> (55-68°C)	5 сек - 1 мин
Элонгация		72°C	1 мин на 1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи*	1	T <sub>m</sub> (55-68°C) 72°C	5 сек - 1 мин 2-3 мин

\* Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при preparative наработке ДНК). T<sub>m</sub> – температура отжига праймера.

## 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 варьирует от 55 до 72°C. Для приблизительного расчета температуры отжига ( $T_m$ ) можно воспользоваться формулой:  
$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$
Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев, повышение температуры отжига на пять градусов ( $T_m + 5^{\circ}\text{C}$ ) 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 1.5 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.

## Клонирование ПЦР-продуктов в TA-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в rAL2-T вектор (кат.# TA002) 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.

## Продукты и услуги компании Евроген

### Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот **P**»»»

Маркеры длин ДНК **P**»»»

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**»»»

Приготовление библиотек кДНК **P**»»» **S**»»»

Синтез кДНК и RACE **P**»»» **S**»»»

Клонирование ДНК **P**»»» **S**»»»

Нормализация кДНК **P**»»» **S**»»»

Практикум по генной инженерии **P**»»»

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**»»»

Секвенирование по Сэнгеру **S**»»»

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**»»»

Синтез генов **S**»»»

Сайт-направленный мутагенез **S**»»»

*Техническая поддержка: [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)*

**P**»»» – ссылка на страницу ПРОДУКТА

**S**»»» – ссылка на страницу УСЛУГИ

### Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**»»»

Флуоресцентные белки **P**»»»

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**»»»

Антитела против флуоресцентных белков **P**»»»

Временная трансфекция клеточных линий **S**»»»

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**»»»

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**»»»

*Техническая поддержка: [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)*

### Молекулярная медицина

Молекулярная онкология и молекулярная генетика наследственных заболеваний **S**»»»

*Техническая поддержка: [oncology@evrogen.ru](mailto:oncology@evrogen.ru)*

Евроген  
Москва 117997  
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корп. 70 (Технопарк ИБХ)  
Тел.: +7 (495) 988-4083  
Факс: +7 (495) 988-4085  
[www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)  
[order@evrogen.ru](mailto:order@evrogen.ru)