

Encyclo полимеразы

Версия 2 от 25 апреля 2022 г.

Encyclo полимеразы 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 (например, SYBR Green I, кат. # PB025 S/M, Евроген).

Кат. #	Кол-во	Состав
PK002 S	200 р-ций объемом 25 мкл	50X Encyclo polymerase Mix, 100 μ l 10X Encyclo buffer, 600 μ l
PK002 L	1 000 р-ций объемом 25 мкл	50X Encyclo polymerase Mix, 5 \times 100 μ l 10X Encyclo buffer, 5 \times 600 μ l

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

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 °С).
- 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 нагревающейся крышки в амплификаторе, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Компонент	Кол-во на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	–
10X Епсусло buffer	2.5 мкл	1X
dNTP mix (10 mM each)	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 пг – 200 нг на р-цию
50X Епсусло polymerase Mix	0.5 мкл	1X

Епсусло полимеразы неактивны при комнатной температуре. Фермент активируется после прогрева реакционной смеси в первом цикле денатурации.

Епсусло буферы необходимы для оптимальной работы Епсусло полимеразы. Использование буферов 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 °С	1–3 мин
Денатурация		92–95 °С	5 с – 1 мин
Отжиг	10–35	Tm* (55–68 °С)	5 с – 1 мин
Элонгация		72 °С	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	1	72 °С	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 °С. 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 °С) 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.

Клонирование ПЦР-продуктов в TA-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в рAL2-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, корпус 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru