

## **KTN-HS полимераз**

Версия 01 от 8 октября 2018 г.

KTN-HS — генетически модифицированная рекомбинантная Taq-полимераза с "горячим стартом". В отличие от Taq-полимеразы, KTN-HS лишена 5'>3' и 3'>5' экзонуклеазной активности, а так же более процессивна и имеет повышенную точность синтеза.

KTN-HS используется в ПЦР и ПЦР-РВ, где не требуется экзонуклеазная активность. Например, в технологиях Scorpion, Amplifluor, LUX и других, основанных на изменении конформации зонда без его разрушения.

<b>Кат. #</b>	<b>Количество</b>	<b>Состав</b>
PK025S	200 реакций объемом 25 мкл	50X KTN-HS полимераз, 100 мкл 10X KTN-HS буфер без $Mg^{2+}$ , 600 мкл Раствор $MgCl_2$ (50 мМ), 300 мкл

**Хранение и транспортировка:** при  $-20^{\circ}C$ .

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки — 1 год со дня поставки.

### **Область применения**

- ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных зондов или праймеров по технологиям Scorpion, Amplifluor, LUX и другим, основанным на изменении конформации зонда без его разрушения;
- Плавление с использованием меченых и немеченых зондов, HRM плавление ампликонов;
- Клонирование продуктов ПЦР в T-векторы (pAL2-T, кат. # TA002 или pKAN-T, кат. # TA003, Евроген);

- ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующих красителей (например, SYBR Green I, кат. ## PB025S, PB025M, Евроген).

### **Основные свойства KTN-HS полимеразы**

- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (5–10 с, 95 °С);
- 5'>3' ДНК-полимеразная активность;
- Отсутствует 5'>3' и 3'>5' экзонуклеазная активность;
- Синтез фрагментов до 5 т.п.о.;
- Терминальная трансферазная активность (нематрично присоединяет дезоксиаденозин к 3'-концу ПЦР-продукта).

### **Оптимизация концентрации ионов $Mg^{2+}$**

10X KTN-буфер не содержит ионов магния. 50 мМ раствор  $MgCl_2$  прилагается отдельно.

Рекомендуемая концентрация ионов магния в 1X реакционном буфере — 3.5 мМ. Для некоторых задач требуется провести оптимизацию концентрации магния (в диапазоне от 2.0 до 5.5 мМ).

Поскольку магний является кофактором полимеразы, высокая концентрация ионов  $Mg^{2+}$  увеличивает выход реакции. Однако, одновременно снижается ее специфичность и растёт неспецифическая (фоновая) амплификация.

В таблице приведен расчет объема добавляемого раствора 50 мМ  $MgCl_2$  для получения соответствующей концентрации ионов магния в реакционной смеси.

Добавляемый объем 50 мМ $MgCl_2$ в 25 мкл реакц. смеси (мкл)	1.0	1.1	1.25	1.35	1.5	1.75	2.0
Конечная концентрация ионов магния в реакц. смеси (мМ)	2.0	2.2	2.5	2.7	3.0	3.5	4.0

### **Рекомендации по режиму амплификации**

- Предварительная денатурация в течение 2–3 мин рекомендуется для амплификации геномной ДНК.

В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0.5–1 мин.

- Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура. Температура отжига определяется структурой праймеров и варьируется от 55 до 72 °С.

Для приблизительного расчета температуры отжига ( $T_m$ ) можно воспользоваться формулой:

$$T_m (\text{°C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$

Оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев, повышение температуры отжига на пять градусов ( $T_m + 5\text{°C}$ ) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР.

- Рекомендуется по возможности минимизировать количество циклов ПЦР, так как избыточное их количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.

### **Клонирование ПЦР-продуктов в Т-векторы**

Продукт ПЦР может быть клонирован в Т-векторы (pAL2-T или pKAN-T) 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. Рекомендуется проводить очистку ДНК на колонке или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением, так как использование неочищенного ПЦР продукта сильно снижает эффективность клонирования. В реакцию лигирования рекомендуется взять 100–200 нг ДНК.

### **Ограничения к использованию**

- KTN-HS полимеразу нельзя использовать для технологии TaqMan, где разгорание зонда происходит в результате 5'>3' экзонуклеазной активности полимеразы. Для решения таких задач рекомендуется использовать HS-Taq ДНК-полимеразу (кат. ## РК017S/L/H/B, РК018);
- Для ПЦР-PB с интеркалирующими красителями (SYBR Green I, EvaGreen) рекомендуется снизить количество KTN-HS полимеразы в реакции и использовать как 100–150X.

## 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 геной 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)*

### Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии и генетики 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)