

Tersus полимераз

Версия 01 от 18 августа 2022 г.

Tersus полимераз представляет собой специально разработанную смесь термостабильных ДНК полимераз для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц. Tersus полимераз комплектуется улучшенным Tersus Plus буфером, увеличивающим эффективность ПЦР.

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 и др.).

Кат. #	Состав	Кол-во
PK123S	50X смесь полимераз Tersus, 100 мкл; 10X Tersus Plus буфер, 600 мкл	200 р-ций объемом 25 мкл
PK123L	50X смесь полимераз Tersus, 5 x 100 мкл; 10X Tersus Plus буфер, 5 x 600 мкл	1000 р-ций объемом 25 мкл

Хранение и транспортировка: при -20°C .

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

Основные свойства Tersus полимеразы

- Высокая точность синтеза.
- $5' \rightarrow 3'$ ДНК-полимеразная активность (до 10 т.п.н.).
- Отсутствие $5' \rightarrow 3'$ экзонуклеазной активности.
- Корректирующая $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (5–10 сек, 95°C).
- 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 нагревающей крышки в амплификаторе, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

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 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 Tersus полимераза	0.5 мкл	1X
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	—

Tersus полимераза неактивна при комнатной температуре. Фермент «активируется» после прогрева реакционной смеси в первом цикле денатурации.

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

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.

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	92–95 °C	1–3 мин
Денатурация		92–95 °C	5 с – 1 мин
Отжиг	10–35	Tm* (55–68 °C)	5 с – 1 мин
Элонгация		72 °C	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	1	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 °С. Для приблизительного расчета температуры отжига (T_m) можно воспользоваться формулой:

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





Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов ($T_m + 5 \text{°C}$) 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 1–1.5 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 (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.









Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу НАБОРА





Выделение и очистка нуклеиновых кислот    









Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ    





Синтез и амплификация кДНК       

Клонирование ДНК        

Выявление контаминации микоплазмой    





Оценка ДНК    

Нормализация кДНК        

Практикум по геной инженерии    

Генотипирование    

Синтез олигонуклеотидов и зондов    

Секвенирование по Сэнгеру    

NGS секвенирование    

Синтез генов    

Сайт-направленный мутагенез    

Синтез органических соединений    

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

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