

Tersus полимераза

Tersus полимераза представляет собой специально разработанную смесь термостабильных ДНК полимераз для высокоточной и специфичной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц. Tersus полимераза 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. #	Кол-во	Состав
PK123S	200 р-ций объемом 25 мкл	50X смесь полимераз Tersus, 100 мкл; 10X Tersus Plus буфер, 600 мкл
PK123L	1000 р-ций объемом 25 мкл	50X смесь полимераз Tersus, 5x100 мкл; 10X Tersus Plus буфер, 5x600 мкл

Хранение и транспортировка: -20 °С.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.

Основные свойства Tersus полимеразы

- высокая точность синтеза
- 5'>3' ДНК-полимеразная активность (до 3 т.п.н.)
- отсутствие 5'>3' экзонуклеазной активности
- корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность
- быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (5-10 сек, 95 °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.

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 полимеразы	0.5 мкл	1X
Стерильная вода	до 25 мкл	-

Tersus полимеразы неактивны 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 3 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	10-38	T _m (55-68 °C)	5 с - 1 мин
Элонгация		72 °C	1 мин на 1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи*	1	T _m (55-68 °C) 72 °C	5 с - 1 мин 2-3 мин

* Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК). T_m – 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 варьируется от 55 до 72 °С. Для приблизительно-го расчета температуры отжига (T_m) можно воспользоваться формулой:
$$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$
Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов ($T_m + 5 °C$) 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, 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

H >>> – ссылка на страницу НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **H** >>>

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **H** >>>

Синтез и амплификация кДНК **H** >>> **C** >>>

Клонирование ДНК **H** >>> **C** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **H** >>>

Оценка ДНК **H** >>>

Нормализация кДНК **H** >>> **C** >>>

Практикум по геной инженерии **H** >>>

Генотипирование **H** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **C** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **C** >>>

NGS секвенирование **C** >>>

Синтез генов **C** >>>

Сайт-направленный мутагенез **C** >>>

C >>> – ссылка на страницу СЕРВИСА

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