



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

IQ-полимераза

Кат. номер E-15001, E-15005

Описание фермента

IQ-полимераза является Pfu-подобным ферментом, полученным путем слияния термостабильной ДНК-полимеразы термофильных архебактерий и ДНК-связывающего белка. В IQ-полимеразу была внесена аминокислотная замена для снижения сродства фермента к матрицам, содержащим уридин, что позволяет как амплифицировать матрицы с уридином, так и встраивать уридин во время синтеза.

IQ-полимераза обладает 5'→3' полимеразной активностью, 3'→5' экзонуклеазной корректирующей активностью и синтезирует продукты с тупыми концами. IQ-полимераза в 4 раза точнее¹ относительно Фьюжн 2.0 полимеразы (Кат. номер E-14001, E-14005) и обладает повышенной скоростью синтеза цепи относительно Фьюжн ДНК-полимеразы (кат. № E-11001, E-11005)². IQ-полимераза способна синтезировать последовательности до 15 т.п.н.

Фермент IQ-полимераза поставляется с 5х реакционным буфером (1х буфер содержит 3 мМ хлорида магния).

Область применения:

1. IQ-полимераза подходит для высокоточной амплификации фрагментов ДНК размером до 15 т.п.н. и их последующего клонирования.
2. IQ-полимераза применима для амплификации поврежденной или деградированной ДНК, а также для ДНК после бисульфитной конверсии.
3. IQ-полимераза применима в ПЦР с матрицами содержащими уридин.

Примеры использования IQ-полимеразы представлены в конце описания.

Источник

IQ-полимераза выделена из штамма *E.coli*, содержащего плазмиду с клонированным фрагментом ДНК, состоящим из слитых генов термостабильной ДНК-полимеразы и ДНК-связывающего белка архебактерий.

Единицы активности

Одна единица активности соответствует количеству фермента, необходимому для включения 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию ДНК за 30 мин при 74°C.

¹Точность фермента определяли методом NGS секвенирования [A. M. de Paz etc. High-resolution mapping of DNA polymerase fidelity using nucleotide imbalances and next-generation sequencing, *Nucleic Acids Res*, V. 46, 2018, P. e78, doi:10.1093/nar/gky296]

² Сравнение скорости синтеза проводили по присоединению нуклеотидов к меченному праймеру. Подробнее методика описана в разделе «Примеров использования IQ-полимеразы»

Концентрация фермента и фасовки: 1 ед.а./мкл.

| Кат № | Название | Количество | Объем фермента | Объем 5x реак. буфера |
|---------|---------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| E-15001 | IQ-полимераза | 100 ед. активности | 100 мкл | 1 мл |
| E-15005 | IQ-полимераза | 500 ед. активности | 500 мкл | 5 мл |

Буфер хранения

Фермент находится в растворе следующего состава: 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5 при 25°C), 100 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА, 200 мкг/мл БСА, 0,1% Tween 20, 50% глицерин.

Контроль качества

Каждая партия фермента тестируется на электрофоретическую чистоту в SDS-ПААГ, активность фермента, отсутствие неспецифической дезоксирибонуклеазной активности.

Протокол проведения стандартной реакции ПЦР с IQ-полимеразой

1. Смешайте индивидуальные компоненты в пробирке согласно таблице (для оптимального результата при замешивании реакционной смеси держите компоненты во льду):

| Компонент | Реакционная смесь, 25 мкл | Реакционная смесь, 50 мкл | Конечная концентрация |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 5x реакционный буфер | 5 мкл | 10 мкл | 1x |
| 50x смесь dNTP (по 10 мМ каждый, NM10-0100) | 0,5 мкл | 1 мкл | по 200 мМ каждого dNTP |
| Прямой праймер, 2 мкМ | 2,5 мкл | 5 мкл | 200 нМ ¹ |
| Обратный праймер, 2 мкМ | 2,5 мкл | 5 мкл | 200 нМ ¹ |
| Образец ДНК | переменный | переменный | от 1 пг до 250 нг ² |
| IQ-полимераза, 1 ед.а./мкл | 0,5 мкл | 1 мкл | 1 е.а. на 50 мкл реак. смеси |
| Вода стерильная (SP010-05) | до 25 мкл | до 50 мкл | - |

¹ концентрация праймеров может варьировать в пределах 10-500 нМ.

² для геномной ДНК рекомендуется использовать от 50 до 250 нг на реакцию, для плазмид и ДНК вирусов – от 1 до 10 нг.

2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирки и «сбросьте капли» с помощью непродолжительного центрифугирования.

3. Перенесите пробирку с реакционной смесью в предварительно нагретый амплификатор.

4. Используйте следующую программу для стандартной ПЦР:

| № | Стадия | Температура и время | Количество циклов |
|-----|------------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | Предварительная денатурация | 96–98°C, 120–30 сек | 1 цикл |
| 2.1 | Денатурация | 96°C, 5–10 сек | |
| 2.2 | Отжиг праймеров ¹ | 50–72°C, 10–30 сек | 25–35 циклов |
| 2.3 | Элонгация | 72°C, 10–20 сек/1 т.п.н. | |
| 3 | Финальная элонгация | 5–10 мин | 1 цикл |

¹ при амплификации больших фрагментов (≥ 5 т.п.н.) рекомендуется пропускать данную стадию

5. Проанализируйте продукты ПЦР в агарозном геле. Образцы предварительно необходимо смешать с буфером для внесения образцов в гель (D-3002).

Условия хранения и транспортировки

Хранить при температуре -20°C .

Допускается транспортирование при температуре не выше $+8^{\circ}\text{C}$ в течение трех суток.

Примеры использования IQ-полимеразы

1) Амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. при разном времени элонгации.

Суть анализа: определить эффективность амплификации фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. при различном времени стадии элонгации.

Условия реакции.

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Праймеры, по 0,2 пмоль/мкл каждого: прямой 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'; обратный 5'-CCATGATTCAGTGTGCCCGTCTGG-3'; размер амплифицируемого фрагмента ~ 2 т.п.н.

Смесь dNTP ([NM10-0100](#)): по 0,2 мМ каждого.

Фермент: IQ-полимераза, 1 е.а. на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для IQ-полимеразы.

Программа реакции.

| | |
|-----------|--------------------------------|
| 1 цикл | 96°C - 120 сек |
| 30 циклов | 96°C - 10 сек |
| | 72°C - 3, 6, 9, 12, 15, 20 сек |
| 1 цикл | 72°C - 5 мин |

Анализ продуктов ПЦР в 1% агарозном геле.

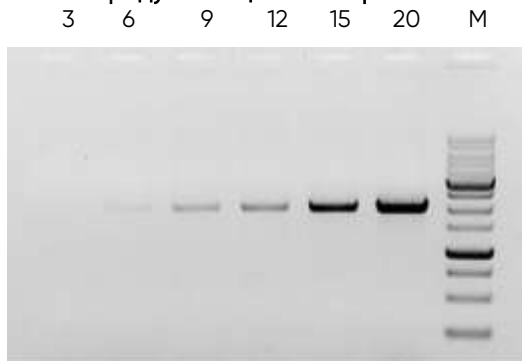


Рис. 1. Продукты, полученные с различным временем элонгации. На дорожках указано время элонгации в секундах. М – ДНК маркер «Sky-High» ([S-8000](#)).

2) Амплификация фрагментов ДНК размером 2, 4, 6, 8, 10 т.п.н. при фиксированном времени элонгации: 2 минуты.

Условия реакции.

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Смесь dNTP ([NM10-0100](#)): по 0,2 мМ каждого.

Фермент: IQ-полимераза, 1 е.а. на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для IQ-полимеразы.

Концентрация праймеров в реакционной смеси по 0,2 пмоль/мкл каждого; размеры амплифицируемых фрагментов: 2, 4, 6, 8, 10 т.п.н.

Структуры праймеров:

| Размер фрагмент а | Структура обратного праймера (5' – 3') | Структура прямого праймера (5' – 3') |
|-------------------|--|--------------------------------------|
| 2 т.п.н. | CCATGATTCAGTGTGCCCGTCTGG | CCTGCTCTGCCGCTTCACGC |
| 8 т.п.н. | GCCTCGTTGCGTTTGTTCACGC | |
| 10 т.п.н. | GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCCAGG | |
| 4 т.п.н. | CCAGGACTATCCGTATGACTACG | CCTGCTCTGCCGCTTCACGCAGTGC |
| 6 т.п.н. | GAGATGGCATATTGCTACGCAAGA | |

Программа реакции.

| | |
|-----------|----------------|
| 1 цикл | 96°C – 120 сек |
| 30 циклов | 96°C – 10 сек |
| | 72°C – 2 мин |
| 1 цикл | 72°C – 5 мин |

Анализ продуктов ПЦР в 1% агарозном геле.

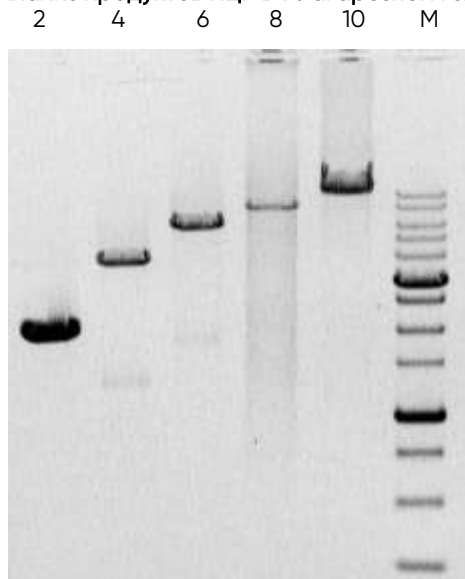


Рис. 2. Продукты, полученные с различными парами праймеров.

На дорожках указан размер синтезируемых фрагментов, в т.п.н. М – ДНК маркер «Sky-High» ([S-8000](#)).

3) Амплификация фрагментов ДНК размером 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 и 18 т.п.н. при фиксированном времени элонгации: 5 минут.

Условия реакции.

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Смесь dNTP ([NM10-0100](#)): по 0,2 мМ каждого.

Фермент: IQ-полимераза, 1 е.а. на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для IQ-полимеразы.

Концентрация праймеров в реакционной смеси по 0,2 пмоль/мкл каждого; размеры амплифицируемых фрагментов: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 и 18 т.п.н.

Структуры праймеров:

| Размер фрагмента | Структура обратного праймера (5' – 3') | Структура прямого праймера (5' – 3') |
|------------------|--|--------------------------------------|
| 1 т.п.н. | GATGACGCATCCTCACGATAATATCCGG | CCTGCTCTGCCGCTTCACG C |
| 2 т.п.н. | CCATGATTCAGTGTGCCCGTCTGG | |
| 8 т.п.н. | GCCTCGTTGCGTTTGTTCACG | |
| 10 т.п.н. | GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCCAGG | |
| 12 т.п.н. | TCTTCCTCGTGCATCGAGCTATTCGG | |
| 15 т.п.н. | CTTGTTCCCTTGCCGCGAGAATGG | |
| 18 т.п.н. | GCGACACTGAATACGGGGCAACC | |
| 4 т.п.н. | CCAGGACTATCCGTATGACTACG | CCTGCTCTGCCGCTTCACG CAGTGC |
| 6 т.п.н. | GAGATGGCATATTGCTACGCAAGA | |

Программа реакции.

| | |
|-----------|----------------|
| 1 цикл | 96°C – 120 сек |
| 30 циклов | 96°C – 10 сек |
| | 72°C – 5 мин |
| 1 цикл | 72°C – 10 мин |

Анализ продуктов ПЦР в 1% агарозном геле.

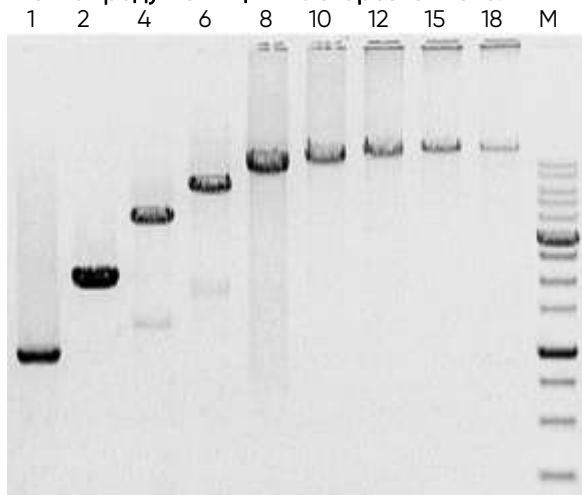


Рис. 3. Продукты, полученные с различными парами праймеров. На дорожках указан размер синтезируемых фрагментов, в т.п.н. М – ДНК маркер «Sky-High» ([S-8000](#)).

4) Сравнение скорости присоединения нуклеотидов для Фьюжн ДНК-полимеразы и IQ-полимеразы.

Для сравнения скорости присоединения нуклеотидов был использован стационарный кинетический анализ при 20 °С для определения параметров аффинности связывания dNTP (K^{dNTP}_m) и максимальной скорости включения dNTP (k_{cat}). В качестве ДНК-матрицы использовали синтетический 44-звенный олигодезоксирибонуклеотид, в качестве праймера – 24-звенный 5'-FAM меченный олигодезоксирибонуклеотид (Рис. 4). Кинетические кривые накопления продукта, соответствующего присоединению первого нуклеотида, были аппроксимированы экспоненциальным уравнением, зависимость наблюдаемой константы скорости от концентрации dNTP аппроксимировали уравнением Михаэлиса-Ментена (Рис. 1). Как видно на Рис. 4, IQ-полимераза значительно быстрее удлиняла ДНК-праймер, чем Фьюжн ДНК-полимераза. Значение K^{dNTP}_m было одинаковым для обеих ДНК-полимераз (среднее значение составило 36,2 мкМ), тогда как значение k_{cat} в 12 больше для ДНК-полимеразы IQ.

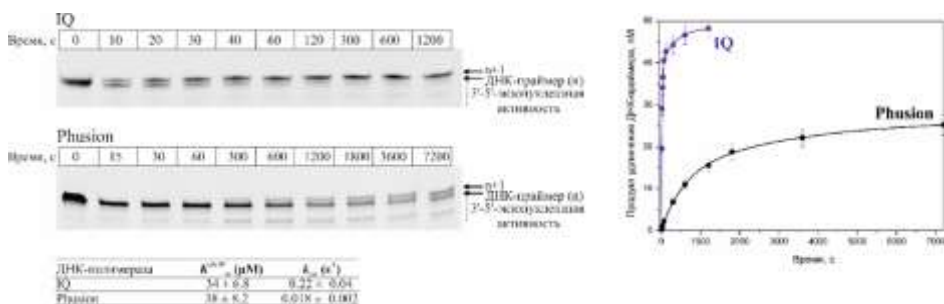


Рис. 4. Удлинение ДНК-праймера под действием различных ДНК-полимераз при 20°С. Представлен ПААГ и кинетические кривые накопления продуктов удлинения ДНК-праймера в присутствии 10 мкМ dТТР.

Обозначения:

«Phusion» – Фьюжн ДНК-полимераза (кат. № E-11001, E-11005);

«IQ» – IQ-полимераза.

Продукция компании Биолабмикс

Наборы для
выделения
ДНК/РНК



Наборы и смеси
для ПЦР



ОТ и ОТ-ПЦР



Изотермическая
амплификация



ДНК-маркеры



Ферменты



Олиго-
нуклеотиды



Платформа
для синтеза
мРНК



Маркеры
молекулярной
массы белков



Host cell
DNA detection

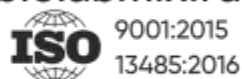


Контрактное
производство

Собственные
разработки

sales@biolabmix.ru
8 800 600 88 76

www.biolabmix.ru



ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ
НА НАШУ ГРУППУ В ВК