



Фьюжн 2.0 полимеразы

Кат. номер E-14001, E-14005

Описание фермента

Продукт представляет собой набор реагентов, состоящий из трех компонентов:

- фермент Фьюжн 2.0 ДНК-полимеразы (1 ед/мкл);
- 5x реакционный буфер для Фьюжн 2.0 (содержит 2,5 мМ ионов магния);
- 5x реакционный буфер ФьюжнПлюс (содержит 5 мМ ионов магния).

Фьюжн 2.0 полимеразы является модифицированным вариантом Фьюжн ДНК-полимеразы (продукт № E-11001), полученной путем слияния термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающего белка термофильных архей вида *Saccharolobus solfataricus* (Sso7d). В полимеразу Фьюжн 2.0 был добавлен ряд мутаций, повышающих точность фермента. Благодаря этому Фьюжн 2.0 полимеразы, обладает повышенной точностью относительно своего первоначального варианта Фьюжн ДНК-полимеразы (продукт № E-11001) примерно в 3 раза или в ~15 раз относительно «нативной» Taq ДНК-полимеразы (продукт E-3001)*. Фьюжн 2.0 полимеразы обладает 5'→3' полимеразной активностью, 3'→5' экзонуклеазной активностью и синтезирует продукты с тупыми концами.

* данные получены путем амплификации фрагментов ДНК различными полимеразы, клонирования ампликонов в вектор, трансформации клеток, и секвенсирования фрагментов из нескольких произвольных клонов, содержащих вектор со встроенными фрагментами ДНК.

Область применения:

1. Фьюжн 2.0 полимеразы подходит для высокоточной амплификации фрагментов ДНК размером до 10 т.п.н. (гарантировано для матрицы ДНК фага лямбда) и их последующего клонирования. Внимание! Для высокоточной амплификации рекомендуется использовать 5x реакционный буфер для Фьюжн 2.0.
2. Фьюжн 2.0 полимеразы в сочетании с 5x реакционным буфером ФьюжнПлюс подходит для амплификации фрагментов ДНК методом ПЦР из различных образцов с высоким содержанием ингибирующих веществ различной природы (гепарин, кровь, почвенный экстракт, ЭДТА, СДС и прочие). Не рекомендуется использовать буфер ФьюжнПлюс для высокоточной амплификации, в виду повышенного содержания различных стабилизаторов и усилителей ПЦР. Также не рекомендуется использовать буфер ФьюжнПлюс для амплификации фрагментов размером более 5 т.п.н.

Примеры использования Фьюжн 2.0 полимеразы с различными буферами представлены в конце описания.

Источник

Фьюжн 2.0 полимеразы выделена из штамма *E.coli* содержащего плазмиду с клонированным фрагментом ДНК, состоящим из слитых генов мутантной термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* и ДНК-связывающего белка *Sulfolobus solfataricus*.

Единицы активности

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

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

Кат №	Название	Количество	Объем фермента	Объем буферов
E-14001	Фьюжн 2.0 полимеразы	100 ед. активности	100 мкл	по 2 мл
E-14005	Фьюжн 2.0 полимеразы	500 ед. активности	500 мкл	по 10 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 Фьюжн 2.0 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 мкМ 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
Фьюжн 2.0 полимеразы, 1 ед.а./мкл	0,12-0,25 мкл	0,25-0,5 мкл	0,25-0,5 е.а. на 50 мкл реак. смеси
Вода стерильная (SP010-05)	до 25 мкл	до 50 мкл	-

¹концентрация 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 (96–98°C).
4. Используйте следующую программу для стандартной ПЦР:

№	Стадия	Температура и время	Количество циклов
1	Предварительная денатурация	96–98°C, 30–120 сек	1 цикл
2.1	Денатурация	96°C, 5–10 сек	25–35 циклов
2.2	Отжиг праймеров	50–72°C, 10–30 сек	
2.3	Элонгация	72°C, 15–30 сек/1 т.п.н.	
3	Финальная элонгация	5–10 мин	1 цикл

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

Условия хранения и транспортировки

Хранить при температуре –20°C.

Допускается транспортирование при температуре не выше +8°C в течение трех суток.

Примеры использования Фьюжн 2.0 полимеразы с различными реакционными буферами

Амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии цельной крови.

Суть анализа: амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии различного количества цельной крови.

Условия реакции.

Кровь: цельная кровь лабораторных мышей.

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Праймеры из работы Wang Y. с соавторами [DOI: [10.1093/nar/gkh271](https://doi.org/10.1093/nar/gkh271)]: прямой – 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'; обратный – 5'-CCATGATTCAAGTGTGCCGCTCTGG-3'; концентрация по 0,2 пмоль/мкл каждого; размер амплифицируемого фрагмента ~ 2 т.п.н.

Смесь dNTP (NM10-0100): по 0,2 mM каждого.

Фермент: Фьюжн 2.0 полимеразы, 0,25 ед на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для Фьюжн 2.0 полимеразы и 5x буфер ФьюжнПлюс.

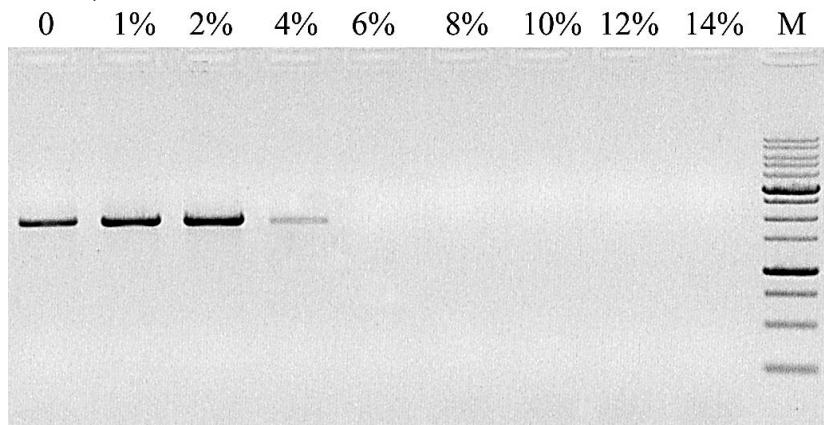
Программа реакции.

1 цикл	98°C – 120 сек
25 циклов	96°C – 10 сек 72°C – 1 мин
1 цикл	72°C – 5 мин

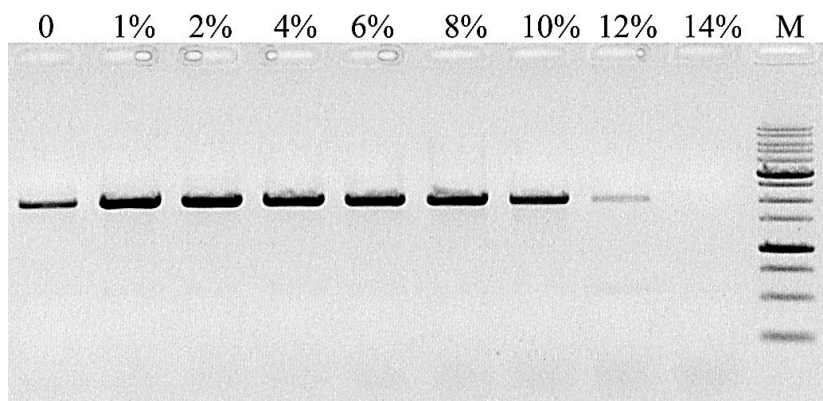
Анализ продуктов ПЦР в 0,8% агарозном геле.

На дорожках указана объемная доля добавленной цельной крови в реакционной смеси (V/V).

Продукты, полученные с использованием реакционного буфера для Фьюжн 2.0 полимеразы.



Продукты, полученные с использованием реакционного буфера ФьюжнПлюс.



M – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).

**Примеры использования Фьюжн 2.0 полимеразы
с различными реакционными буферами**

**Амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии буфера
Эдвардса.**

Суть анализа: амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии различного количества буфера Эдвардса.

Условия реакции.

Буфер Эдвардса: 1x буфер (200 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS).

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Праймеры из работы Wang Y. с соавторами [DOI: [10.1093/nar/gkh271](https://doi.org/10.1093/nar/gkh271)]: прямой – 5'-ССТГСТСТGCCGCTTCACGC-3'; обратный – 5'-ССАТГАТТСАГТGTGCCCGTCTGG-3'; концентрация по 0,2 пмоль/мкл каждого; размер амплифицируемого фрагмента ~ 2 т.п.н.

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

Фермент: Фьюжн 2.0 полимеразы, 0,25 ед на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для Фьюжн 2.0 полимеразы и 5x буфер ФьюжнПлюс.

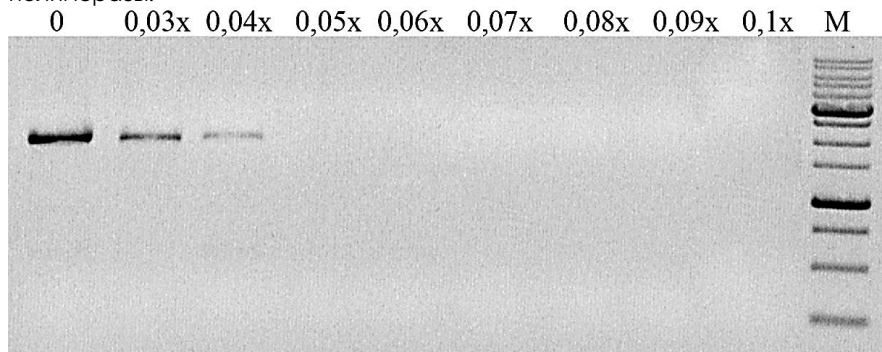
Программа реакции.

1 цикл	98°C – 120 сек
25 циклов	96°C – 10 сек 72°C – 1 мин
1 цикл	72°C – 5 мин

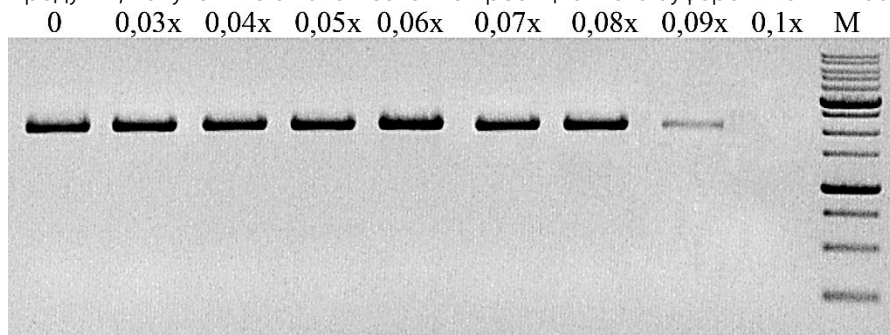
Анализ продуктов ПЦР в 0,8% агарозном геле.

На дорожках указана конечная концентрация буфера Эдвардса в реакционной смеси (0,03x – 1,5 мкл образца на 50 мкл реакционной смеси; 0,04x – 2 мкл; 0,05x – 2,5 мкл и т.д.).

Продукты, полученные с использованием реакционного буфера для Фьюжн 2.0 полимеразы.



Продукты, полученные с использованием реакционного буфера ФьюжнПлюс.



M – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).

Примеры использования Фьюжн 2.0 полимеразы с различными реакционными буферами

Амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии почвенного экстракта.

Суть анализа: амплификация фрагмента ДНК размером 2 т.п.н. в присутствии различного количества почвенного экстракта.

Условия реакции.

Почвенный экстракт: приготовлен согласно работе Milko B. Kermekchiev с соавторами [<https://doi.org/10.1093/nar/gkn1055>]. Образец почвы был взят с приусадебного участка поселка Юный Ленинц Новосибирской области (масса почвы составляла 50 г на 500 мл буфера следующего состава: 50 mM Tris pH 9,2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 0,1% Tween 20).

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Праймеры из работы Wang Y. с соавторами [DOI: [10.1093/nar/gkh271](https://doi.org/10.1093/nar/gkh271)]: прямой – 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'; обратный – 5'-CCATGATTCAAGTGTGCCCCGTCTGG-3'; концентрация по 0,2 пмоль/мкл каждого; размер амплифицируемого фрагмента ~ 2 т.п.н.

Смесь dNTP (NM10-0100): по 0,2 mM каждого.

Фермент: Фьюжн 2.0 полимеразы, 0,25 ед на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для Фьюжн 2.0 полимеразы и 5x буфер ФьюжнПлюс.

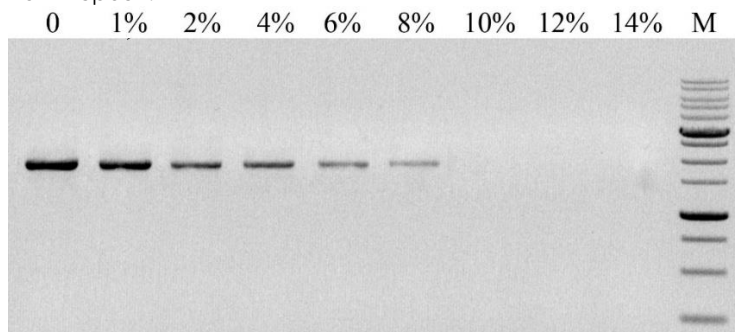
Программа реакции.

1 цикл	98°C – 120 сек
25 циклов	96°C – 10 сек
	72°C – 1 мин
1 цикл	72°C – 5 мин

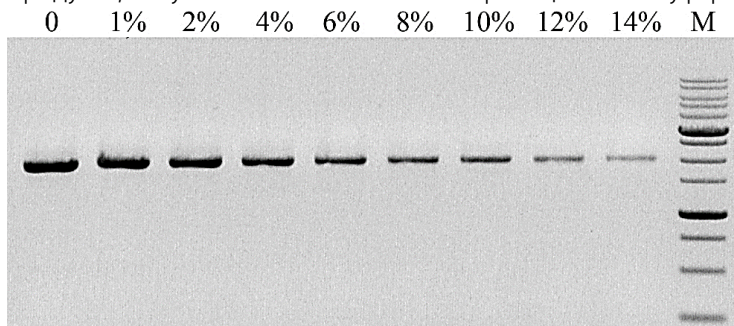
Анализ продуктов ПЦР в 0,8% агарозном геле.

На дорожках указана объемная доля добавленного почвенного экстракта в реакционной смеси (V/V), концентрация исходного почвенного экстракта принималась за 100%.

Продукты, полученные с использованием реакционного буфера для Фьюжн 2.0 полимеразы.



Продукты, полученные с использованием реакционного буфера ФьюжнПлюс.



М – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).

Примеры использования Фьюжн 2.0 полимеразы с различными реакционными буферами

Амплификация фрагментов ДНК размером от 1 до 10 т.п.н.

Суть анализа: амплификация фрагментов ДНК размером 1, 2, 5, 8 и 10 т.п.н. с различными реакционными буферами.

Условия реакции.

Матрица: ДНК фага лямбда 0,4 нг/мкл.

Праймеры из работы Wang Y. с соавторами [DOI: [10.1093/nar/gkh271](https://doi.org/10.1093/nar/gkh271)]:

Размер фрагмента	Структура обратного праймера (5' – 3')
1 т.п.н.	GATGACGCATCCTCACGATAATATCCGG
2 т.п.н.	CCATGATTCAAGTGTGCCCCGTCTGG
5 т.п.н.	CGAACGTCGCGCAGAGAAACAGG
8 т.п.н.	GCCTCGTTGCGTTTGTTCACG
10 т.п.н.	GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCCAGG
Един для всех фрагментов	Структура прямого праймера (5' – 3') CCTGCTCTGCCGCTTCACGC

Концентрация праймеров в реакционной смеси по 0,2 пмоль/мкл каждого.

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

Фермент: Фьюжн 2.0 полимеразы, 0,25 ед на 50 мкл реакционной смеси.

Реакционный буфер: 5x буфер для Фьюжн 2.0 полимеразы и 5x буфер ФьюжнПлюс.

Программа реакции.

1 цикл	98°C – 120 сек
25 циклов	96°C – 10 сек
	72°C – 4 мин
1 цикл	72°C – 7 мин

Анализ продуктов ПЦР в 0,8% агарозном геле.

Продукты, полученные с использованием реакционного буфера для Фьюжн 2.0 полимеразы.

Продукты, полученные с использованием реакционного буфера ФьюжнПлюс.

