



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

## Набор для проведения ПЦР с Фьюжн ДНК-полимеразой

Кат. номер КН041-100, КН041-500

### Описание

Набор реагентов для постановки ПЦР с высокоточной Фьюжн ДНК-полимеразой. В набор входят отдельные компоненты такие как ионы магния, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) и диметилсульфоксид, что позволяет оптимизировать условия амплификации под задачи экспериментатора.

### Состав набора

1. Рекombинантная Фьюжн ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл (слитая термостабильная ДНК-полимераза *P. furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающий белок *S. solfataricus* (Sso7d)). Фермент находится в буфере 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, 0,1% Triton X-100, 50% глицерин.
2. 5x реакционный буфер, состав буфера: 250 мМ Tris-HCl (pH 9,0 при 25°C), 175 мМ KCl, 50 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 500 мМ трегалоза, 500 мкг/мл БСА, 0,5% Tween 20, 5% глицерин.
3. 50x смесь dNTP (по 10 мМ каждого).
4. 100 мМ раствор MgCl<sub>2</sub>.
5. 100% диметилсульфоксид (ДМСО).
6. Вода, обработанная диэтилпиракарбонатом свободная от нуклеаз.

Кат №	Фьюжн ДНК-полимераза	5x реакционный буфер	50x смесь dNTP	100 мМ раствор MgCl <sub>2</sub>	ДМСО	Вода
КН041-100	1x50 мкл (100 е.а. *)	1x0,6 мл	1x50 мкл	1x0,2 мл	1x0,2 мл	1x2,0 мл
КН041-500	1x250 мкл (500 е.а. *)	2x1,5 мл	1x250 мкл	1x1,0 мл	1x1,0 мл	5x2,0 мл

\* одна единица активности соответствует количеству фермента, необходимому для включения 10 нмолей dNTP в кислотонерастворимую фракцию ДНК за 30 мин при 74°C.

## Область применения

Фьюжн ДНК-полимераза обладает повышенной точностью копирования и синтезирует ампликоны с тупыми концами, поэтому набор является хорошим выбором для рутинного клонирования генов и может использоваться для получения методом ПЦР длинных или сложных ампликонов.

## Протокол проведения стандартной реакции ПЦР с Фьюжн ДНК-полимеразой

1. Предварительно разморозьте компоненты набора и перемешайте растворы.
2. Смешайте индивидуальные компоненты в пробирке согласно таблице (для оптимального результата при замешивании реакционной смеси держите компоненты и реакционную смесь 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)	0,5 мкл	1 мкл	по 200 мкМ каждого dNTP
100 мМ раствор MgCl <sub>2</sub>	переменный объем		2–5 мМ <sup>1</sup>
ДМСО (100%)	переменный объем		до 10% (по объему) <sup>2</sup>
Прямой праймер	переменный объем		100–500 нМ
Обратный праймер	переменный объем		100–500 нМ
Образец ДНК	переменный объем		от 1 пг до 250 нг
Фьюжн ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	0,5 мкл	1 мкл	2,0 е.а. /50 мкл реакц. смеси
Вода без нуклеаз	до 25 мкл	до 50 мкл	–

<sup>1</sup> В большинстве случаев мы рекомендуем использовать концентрацию ионов магния в диапазоне 3–4 мМ.

<sup>2</sup> Диметилсульфоксид рекомендуется добавлять в случае использования сложных, GC-богатых матриц, в большинстве случаев достаточно добавки до 5%, но иногда требуется оптимизация. Следует помнить, что добавка ДМСО снижает температуру плавления праймеров, 5% снижает примерно на 2,5°C.

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

*Примечание:* в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю (25–35 мкл) минерального масла.

4. Перенесите пробирку с реакционной смесью в предварительно нагретый амплификатор (95–98°C).

5. Используйте следующую программу для стандартной ПЦР:

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Предварительная денатурация	96–98°C, 30–120 сек	1 цикл
Денатурация	96°C, 5–10 сек	
Отжиг праймеров *	50–72°C, 10–30 сек	25–35 циклов
Элонгация	72°C, 15–30 сек/1 т.п.н.	
Финальная элонгация	5–10 мин	1 цикл

\* при амплификации больших фрагментов ( $\geq 5$  т.п.н.) рекомендуется пропускать данную стадию

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

#### **Условия хранения**

Хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Условия транспортировки**

Допускается транспортирование при температуре не выше  $+25^{\circ}\text{C}$  в течение трех суток.