



Общество с ограниченной ответственностью
«Биосан»
ИНН 5408015901 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@biosan-nsk.ru

Фьюжн ДНК-полимераза (Pfu-Sso7d)

Кат. номер E-11001, E-11005

Описание:

Фьюжн ДНК-полимераза является рекомбинантным полипептидом, состоящим из слитых термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающего белка термофильных архей вида *Sulfolobus solfataricus* (Sso7d). Белок Sso7d связывается с малой бороздкой двухцепочечной ДНК и дополнительно стабилизирует комплекс полимеразы с матрицей. Благодаря этому Фьюжн ДНК-полимераза, обладает повышенной процессивностью, точностью синтеза, скоростью амплификации фрагментов и повышенной устойчивостью к ингибиторам ПЦР по сравнению с нативной Pfu ДНК-полимеразой [1]. Фьюжн ДНК-полимераза обладает 5'→3' полимеразной активностью, 3'→5' экзонуклеазной активностью и синтезирует продукты с тупыми концами.

Область применения:

Фьюжн ДНК-полимераза является хорошим выбором для рутинного клонирования и может использоваться для получения методом ПЦР длинных или сложных ампликонов.

Примеры использования Фьюжн ДНК-полимеразы представлены в конце описания.

Источник

Фьюжн ДНК-полимераза выделена из штамма *E.coli*, содержащего плазмиду с клонированным фрагментом ДНК, состоящим из слитых генов термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающего белка *Sulfolobus solfataricus* (Sso7d).

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: 2 е.а./мкл.

Кат №	Название	Количество	Объем
E-11001	Фьюжн ДНК-полимераза	100 е.а.	50 мкл
E-11005		500 е.а.	250 мкл

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, 0,1% Triton X-100, 50% глицерин.

Контроль качества:

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

Протокол проведения стандартной реакции ПЦР:

1. 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 для Фьюжн ДНК-полимеразы ¹	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 ²
Обратный праймер, 2 мкМ	2,5 мкл	5 мкл	200 нМ ²
Образец ДНК	переменный	переменный	от 1 пг до 250 нг ³
Фьюжн ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	0,5 мкл	1 мкл	2,0 е.а. /50 мкл реакц. смеси
Вода стерильная (SP010-05)	до 25 мкл	до 50 мкл	-

¹ буфер поставляется с ферментом: 1,3 мл для E-11001 и 6,5 мл для E-11005 (1x буфер содержит 2 мМ MgCl₂).

² концентрация праймеров может варьировать в пределах 10–500 нМ.

³ 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 (95–98°C).

4. Используйте следующую программу для стандартной ПЦР:

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95–98°C, 30–120 сек	1 цикл
Денатурация	95°C, 5–10 сек	
Отжиг праймеров ¹	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

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 (например, с D-3002).

Условия хранения и транспортировки:

Хранить при температуре -20°C .

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

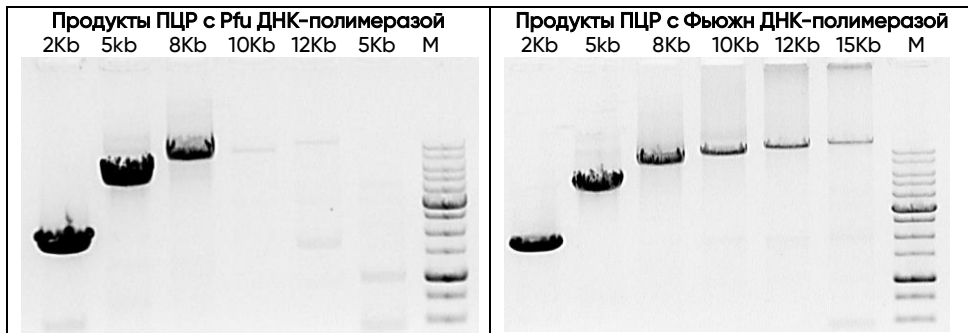
Ссылки

Wang Y. et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro // *Nucleic acids research*. – 2004. – Т. 32. – №. 3. – С. 1197–1207. DOI: 10.1093/nar/gkh271

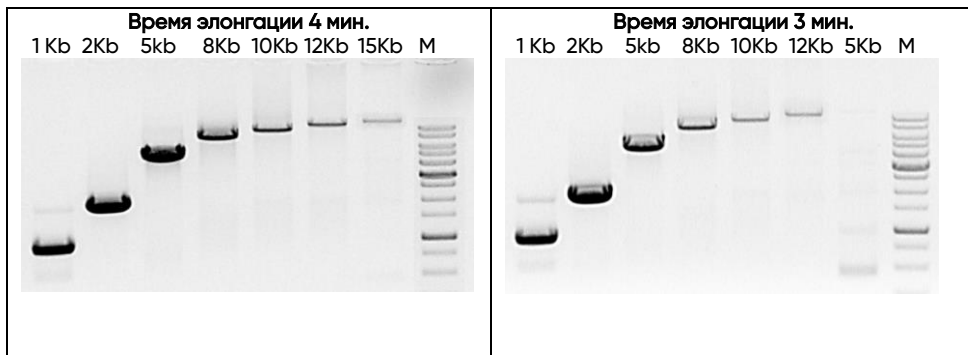
Примеры использования Фьюжн ДНК-полимеразы в сравнении с Pfu ДНК-полимеразой, взятой в качестве предшественника при конструировании Фьюжн ДНК-полимеразы.

За основу реакций использовали условия, описанные в работе Wang Y. с соавторами [DOI: 10.1093/nar/gkh271]. Матрицей служила ДНК фага лямбда 0,5 нг/мкл, структура праймеров указана в упомянутой работе, схема реакции 2х стадийная, общее количество циклов – 25.

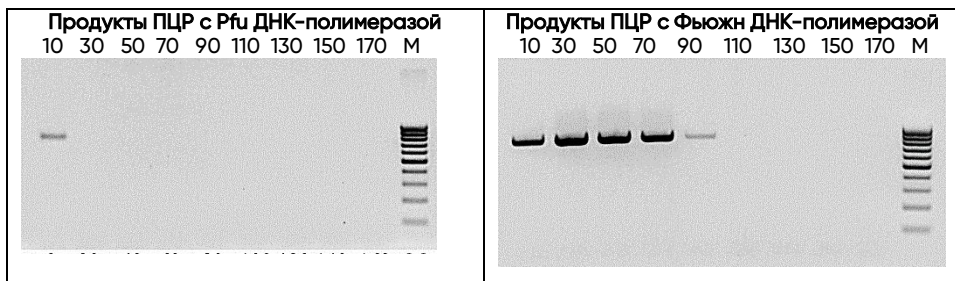
1. Сравнение способности Фьюжн ДНК-полимеразы и Pfu ДНК-полимеразы синтезировать длинные фрагменты. Время элонгации везде составляло 7,5 мин. М – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).



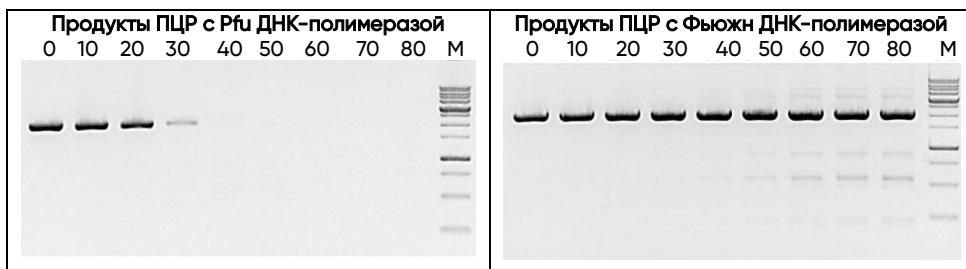
2. Анализ скорости синтеза фрагментов ДНК с помощью Фьюжн ДНК-полимеразы. Изменялось только время элонгации (4 и 3 минуты, соответственно).



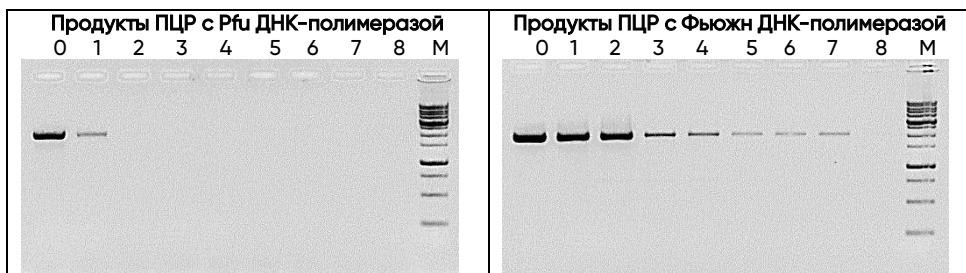
3. Анализ устойчивости к солям Pfu ДНК-полимеразы и Фьюжн ДНК-полимеразы на примере амплификации фрагмента размером 0,9 Kb в присутствии хлорида калия. Время элонгации 1 мин. Дорожки: 0-170, образцы с добавлением в реакционные смеси хлорида калия до 170 мМ, соответственно; М – ДНК маркер «Step 100» (S-8100).



4. Анализ устойчивости к гуанидин гидрохлориду Pfu ДНК-полимеразы и Фьюжн ДНК-полимеразы на примере амплификации фрагмента размером 2 Kb в присутствии гуанидин гидрохлорида. Время элонгации 2 мин. Дорожки: 0-80, образцы с добавлением в реакционные смеси гуанидин гидрохлорида до 80 мМ, соответственно; М – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).



5. Анализ устойчивости к цитрату натрия Pfu ДНК-полимеразы и Фьюжн ДНК-полимеразы на примере амплификации фрагмента размером 2 Kb в присутствии цитрата натрия. Время элонгации 2 мин. Дорожки: 0-8, образцы с добавлением в реакционные смеси цитрата натрия до 8 мМ, соответственно; М – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).



6. Анализ устойчивости к додецилсульфату натрия (SDS) Pfu ДНК-полимеразы и Фьюжн ДНК-полимеразы на примере амплификации фрагмента размером 2 Кб в присутствии SDS. Время элонгации 2 мин. Дорожки: 0-0.04, образцы с добавлением в реакционные смеси SDS до 0,04%, соответственно; М – ДНК маркер «Sky-High» (S-8000).

