

HF-Fuzz ДНК полимеразыДля исследовательских работ *in vitro***Рекомбинантная HF-Fuzz ДНК полимеразы**

(Deoxynucleosidetriphosphate: DNA Deoxynucleosidyltransferase E.C. 2.7.7.7.)

Кат.№	Количество	Источник:
HF-100	100ед.	Штамм <i>Pyrococcus furiosus</i>
HF-500	500ед.	
Описание		<p>HF-Fuzz ДНК полимеразы представляет собой термостабильный химерный белок, выделенный из рекомбинантного штамма <i>E.coli</i>, несущего ген полимеразы <i>Pyrococcus furiosus</i> и неспецифического ДНК связывающего домена.</p> <p>HF-Fuzz ДНК полимеразы катализирует полимеризацию нуклеотидов в dsДНК в направлении от 5'-3' Фермент обладает корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью, которая позволяет избежать включения некорректных нуклеотидов в процессе амплификации.</p> <p>Наличие ДНК связывающего домена увеличивает процессивность полимеразы, а внесение мутаций в полимеразный фрагмент приводит к повышенной резистентности фермента к ингибиторам ПЦР (например компоненты крови) возможности использования фермента в «анти-контаминационной» ПЦР с заменой dTTP на dUTP. В результате амплификации ДНК, с использованием HF-Fuzz полимеразы, образуются продукты в «тупыми концами», необходимыми для клонирования по «тупым концам».</p> <p>За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию за 30 минут при +75°C.</p>
Единица Активности		
Буфер для хранения/разбавления		20mM Tris-HCL (pH 8.0);100mM KCL;0.1mM EDTA; 1mM DTT; 50% глицерин;0.1% Tween 20
Амплификационный буфер 2.5X		250mM Tris-HCL (pH 8.8 at 25°C);150mM KCl; 30mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 3,75mM MgSO ₄ ; 0.25% Tween 20; стабилизаторы
Применение		<ul style="list-style-type: none"> - ПЦР - «Высокоточная» ПЦР - Клонирование - «Высокоточная» ПЦР протяженных ДНК (>8-10Kb для геномной ДНК) - антиконтаминационная ПЦР (с dUTP) - амплификация ДНК из «цельной» и «стабилизированной» (EDTA,гепарин,цитрат) крови - амплификация GC-богатых участков ДНК <p>Эндо- и экзонуклеазные активности не обнаруживаются</p>
Неспецифические активности		
Условия хранения		Хранить HF-Fuzz ДНК полимеразу при -20°C
Условия транспортировки		Можно транспортировать при комнатной температуре. При транспортировке более 3-х дней, желательно использовать лед или хладогент.
Концентрация		2 ед/мкл

Протокол амплификации с HF-Fuzz ДНК полимеразой

ПЦР амплификация с использованием **HF-Fuzz** полимеразы очень похожа на условия использования **Phusion-HF** полимеразы (**ThermoFisher**), **Q5** полимеразы (**NEB**), **iProof** полимеразы (**BioRad**) т.е. HF-Fuzz полимеразы лучше работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров.

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – т.к фермент обладает невысокой остаточной активностью при комнатной температуре.

Приготовьте мастермикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций.

ВНИМАНИЕ! Добавлять HF-Fuzz полимеразу к реакционной массе необходимо в последнюю очередь! Наличие у фермента 3'->5" экзонуклеазной активности может приводить к деградации праймеров в отсутствии dNTP's в растворе.

Смешайте следующие компоненты на льду:

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x Реакционный буфер*	20 µL	10 µL	1X
2,5 mM MIX dNTPs	4 µL	2 µL	0.2 mM каждого
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	От 2-10 нг
HF-Fuzz полимеразы (2 U/µl) *	0.5-1 µL	0.25-0.5 µL	0.02U/µL

- 2,5X Реакционный буфер для HF-Fuzz содержит 1,5mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации. В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации MgCl₂ в интервале 1,5-2,5mM.

Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.

Условия Амплификации

	2-х стадийный ПЦР		3-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	Т°С	время	Т°С	время	
Начальная денатурация	98°С	1-2мин	98°С	1-2мин.	1
Денатурация	98°С	5-10 сек	98°С	5-10 сек	25-35
Отжиг	-	-	55-72*	10-30 сек	
Элонгация	68-72°С***	15 сек/Kb	72°С	15-30 сек/Kb**	
Финальная элонгация	72°С	5-10 мин	72°С	5-10 мин	1
	4°С	hold	4°С	hold	

1)- При амплификации геномной ДНК, для начальной денатурации достаточно 2 мин. При использовании образца крови, в качестве ДНК матрицы рекомендованное время начальной денатурации -5 мин., для полного лизиса клеток крови.

Для **HF-Fuzz** полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-10°С, по сравнению с ПЦР условиями амплификации с использованием Taq полимераз или ферментов на основе Taq (смеси Taq+Pfu, Taq+KlenTaq, KlenTaq+Pfu и т.д.)

2)- Оптимальная температура T_m, рекомендуется как наименьшая температура плавления одного из праймеров, для стандартных олигонуклеотидов <22 н.п.

- Для сравнительно не сложных ДНК матриц (плазмидная ДНК, фаговая ДНК, ВАС клоны) время элонгации может быть уменьшено до 15 сек/Kb.

Для геномной ДНК (человеческой) рекомендуется элонгация не менее 30 сек на 1 Kb, при амплификации ДНК фрагментов превышающих 2Kb. Для фрагментов ДНК длиной менее 1,5Kb. элонгацию можно ограничить 15 сек/Kb.

НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ превышать указанное время элонгирования во избежание образования неспецифических продуктов и уменьшения выхода целевого продукта.

3)- Для проведения двух-стадийной ПЦР, рекомендуется подбирать праймеры, T_m которых находится в пределах 62-70°С. В случае если T_m пары праймеров лежит в области 62-65°С, рекомендуется пользоваться простым равенством для определения стартовой температуры отжига/элонгирования – (72°+ T_m праймера с минимальным значением)/2.

Если T_m праймеров (обоих) > 65°С , то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 70-72°С.

Для определения наиболее эффективной T отжига/элонгирования рекомендуется провести амплификацию в градиенте – это позволит сократить время оптимизации ПЦР.