

HS-Fuzz ДНК полимераза

Для исследовательских работ *in vitro*

Рекомбинантная HS-Fuzz ДНК полимераза

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

Кат.№	Количество	Источник:
HS-100	100ед.	Штамм <i>Pyrococcus furiosus</i> , Специфические мышинные моноклональные антитела
HS-500	500ед.	
Описание		<p>HS-Fuzz ДНК полимераза представляет собой термостабильный химерный белок, выделенный из рекомбинантного штамма <i>E.coli</i>, несущего ген химерной полимеразы <i>Pyrococcus furiosus</i>, неспецифического ДНК связывающего домена и специфических мышинных моноклональных антител.</p> <p>HS-Fuzz ДНК полимераза 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 HS-Fuzz полимеразы, образуются продукты в «тупыми концами», необходимыми для клонирования по «тупым концам».</p> <p>HS-Fuzz ДНК полимераза не обладает активностью при комнатной температуре и в условиях подготовки ПЦР амплификации.</p> <p>Комплекс фермент-антитела диссоциирует при температуре выше 70°C, активируя фермент для амплификации.</p> <p>Наличие блокирующих антител позволяет избежать мисс-прайма и образования праймерных дуплексов, что приводит к повышению эффективности амплификации и увеличению выхода целевого продукта.</p> <p>Фермент обладает повышенной резистентностью к ингибиторам ПЦР (компонентов крови), что позволяет использовать его при амплификации цельной и стабилизированной крови, пятен крови без выделения ДНК.</p>
Единица Активности		За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию за 30 минут при +75°C.
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)

	<ul style="list-style-type: none">- антиконтаминационная ПЦР (с dUTP)-амплификация ДНК из «цельной» и «стабилизированной» (ЕДТА,гепарин,цитрат) крови-амплификация GC-богатых участков ДНК
Неспецифические активности	Эндо- и экзонуклеазные активности не обнаруживаются
Условия хранения	Хранить HS-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 HS-Fuzz ДНК полимеразой

ПЦР амплификация с использованием **HS-Fuzz** полимеразы очень похожа на условия использования **Phusion-HS** полимеразы (**ThermoFisher**), **Q5** полимеразы (**NEB**), **iProof** полимеразы (**BioRad**) т.е. HS-Fuzz полимеразы лучше работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров. Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – т.к фермент не обладает активностью при комнатной температуре, за счет эффективного блокирования активности специфическими антителами. Приготовьте мастермикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций.

Порядок добавления реактивов может быть произвольным, в виду того, что 3'→5' экзонуклеазная активность не проявляется в процессе подготовки ПЦР из-за блокирования активности фермента антителами.

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
HS-Fuzz полимеразы (2 U/µl)	0.5-1 µL	0.25-0.5 µL	0.02U/µL

- 2,5X Реакционный буфер для HS-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 4°С	5-10 мин hold	72°С 4°С	5-10 мин hold	1

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 **HS-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.