

Информация о продукте

FriskyTaq ДНК полимеразаДля исследовательских работ *in vitro***Рекомбинантная FriskyTaq ДНК полимераза**

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

Кат.№	Количество	Источник:
FT-100	100ед.	Штамм <i>Thermus Aquaticus YT1</i>
FT-500	500ед.	
FT-1000	1000 ед.	

Описание	<p>FriskyTaq ДНК полимераза представляет собой химерный термостабильный белок, модифицированный удалением N-концевых аминокислот и неспецифически связывающего ДНК термостабильного домена, выделенный из рекомбинантного штамма <i>E.coli</i>.</p> <p>FriskyTaq ДНК полимераза катализирует полимеризацию нуклеотидов в dsДНК в направлении от 5'→3' в присутствии ионов Mg²⁺, так же, как и полноразмерный фермент. Фермент не обладает 5'→3' экзонуклеазной активностью. FriskyTaq полимераза обладает большей термостабильностью и процессивностью по сравнению с Taq полимеразой.</p> <p>Во FriskyTaq внесены точечные мутации для придания ферменту большей устойчивости при работе с объектами, содержащими значительное количество ингибиторов ПЦР (в частности компонентов крови).</p>
Единица Активности	За одну единицу активности принимается количество фермента, необходимое для перевода 10 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию за 30 минут при +72°C.
Буфер для хранения/разбавления	10mM К-фосфатный буфер (pH 7.0); 100mM KCl; 0.5mM EDTA; 1mM DTT; 50% глицерин, 0.1% Tween-20
Амплификационный буфер 2,5X	<p>2,5X R^{TB} Буфер-1500 содержит 1,5mM MgCl₂ и стабилизаторы фермента.</p> <p>Для оптимизации условий ПЦР возможно потребуется подбор оптимальной концентрации Mg в пределах 1,5-3,5mM (1X)</p> <p>Наличие стабилизаторов в 2,5X R^{TB} Буфер-1500 может понижать температуру плавления праймеров, по сравнению с условиями ПЦР для Taq полимеразы на 1-2 °C.</p>
Применение	<ul style="list-style-type: none"> - ПЦР - ПЦР – ЛД -SNP-анализ -амплификация ДНК последовательностей из крови, без выделения ДНК -«реал-тайм» ПЦР, кроме амплификации с зондами
Неспецифические активности	Эндо - и экзонуклеазные активности не обнаруживаются после инкубации в течение 2-х и 1-го часа, соответственно, 1 мкг, ДНК фага λ и 0.22 мкг ДНК фага λ, гидролизованного рестриктазой EcoR I, при 72°C в присутствии 15-20 ед. активности FriskyTaq ДНК полимеразы.
Условия хранения	Хранить FriskyTaq ДНК полимеразу при -20°C
Условия транспортировки	Можно транспортировать при комнатной температуре. При транспортировке более 3-х дней, желательно использовать лед или хладагент.
Концентрация	2,5 ед./мкл

Протокол амплификации с FriskyTaq ДНК полимеразой

ПЦР амплификация с использованием FriskyTaq полимеразы очень похожа на условия использования стандартной KlenTaq полимеразы, однако FriskyTaq полимеразы успешнее работает при повышенных температурах денатурации (98°C) и отжига праймеров (на 3-6°C выше расчетной температуры плавления праймеров).

Собирать ПЦР реакцию рекомендуется на льду (+4°C).

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

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 20 нг
FriskyTaq полимеразы (2 U/µl)	1 µL	0.5 µL	0.02U/µL

*- 2,5X Реакционный буфер для FriskyTaq 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 – 30-50 мкл.

** - ДНК матрица может быть заменена на образец цельной крови или крови, стабилизированной EDTA

(до конечной концентрации крови в реакционной смеси 5%).

В случае использования образца крови, в качестве объекта исследования, необходимо увеличить 1X концентрацию Mg до **3-4mM** и увеличить концентрацию специфических праймеров до 20-25 пмоль.

Условия Амплификации

	3-х стадийный ПЦР (ДНК матрица)		3-х стадийный ПЦР (кровь)		Кол-во циклов
	Т°C	время	Т°C	время	
Начальная денатурация	98°C	2 мин	98°C	5-10 мин	1
Денатурация	98°C	5-10 сек	98°C	5-10 сек	30-35
Отжиг	55-72*	5-15 сек.	55-72*	5-15 сек	
Элонгация	72°C	15-30 сек/Кб	72°C	15-30 сек/Кб**	
Финальная элонгация	72°C	1-3 мин	72°C	1-3 мин	1
	4°C	hold	4°C	hold	

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

Для FriskyTaq полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-6°C, по сравнению с ПЦР условиями амплификации с использованием Taq полимераз

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

Для геномной ДНК (человеческой) рекомендуется элонгация не менее 30 сек на 1 Кб, в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента.