

**PYROPRO ПОЛИМЕРАЗА**Для исследовательских работ *in vitro***Рекомбинантная PyroPro полимеразы**

Кат.№	Количество	Источник:
PP-05	500ед.	<b>Бактериофаг</b>
PP-1	1000ед.	
<b>Описание</b>	<b>PyroPro Полимераза</b> представляет собой белок, весом 69 KDa, выделенный из рекомбинантного штамма <i>E.coli</i> , несущего ген данной полимеразы. PyroPro Полимераза обладает 3'-5'-обратно-транскриптазной и 5'-3'-полимеразной активностью, способна осуществлять амплификацию с одновременным вытеснением впереди лежащей на матрице комплиментарной цепи ДНК (strand displacement), у фермента отсутствует 3'-5'-экзонуклеазная активность.	
<b>Единица Активности</b>	Одна единица активности PyroPro полимеразы условно равна -1 ед обратной транскриптазы M-MLV при 60°C в реакции элонгации oligodT <sub>12</sub> праймера.	
<b>Буфер для хранения/разбавления</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM EDTA; 0.5 mM DTT; 50% glycerol, 0.1 % Tween-20	
<b>Реакционный буфер,10X</b>	200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 mM KCl, 1 % Tween-20	
<b>Применение</b>	LAMP-амплификация One-Step RT-PCR	
<b>Неспецифические активности</b>	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 <b>PyroPro Полимеразы</b> .	
<b>Условия хранения</b>	<b>PyroPro Полимераза</b> хранится при -20 °C.	
<b>Условия транспортировки</b>	Транспортировку <b>PyroPro Полимеразы</b> можно осуществлять при +4°C.	
<b>Концентрация</b>	10 ед/мкл	

**Протокол 1 One-Step RT-PCR**  
**Реакция обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени с использованием PyroPro Полимеразы.**

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
<b>10-кратный буфер Pyro*</b>	2.5 μl	1-кратный
<b>Прямой праймер (50 μM)</b>	0,2 μl	0,4 μM
<b>Обратный праймер (50 μM)</b>	0,2 μl	0,4 μM
<b>Зонд (50 μM)</b>	0,1 μl	0.2 μM
<b>РНК матрица</b>	Определяется пользователем	1 pg –10 ng РНК
<b>MgCl<sub>2</sub> 100 mM</b>	0,75 μl	3 mM
<b>dNTPsMix 2,5 mM</b>	2 μl	0,2 mM
<b>PyroPro Полимераза (10 U/μl)</b>	0,1 – 0,2 μl	0,04 U/μl
<b>Hot-start Taq- (5 U/μl)**</b>	0,2 – 0,4 μl	0,04 – 0,08 U/μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	до 25 мкл	

\*– Можно использовать буфер следующего состава 10X: 500 mM Трис-НСl (рН 8.8), 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 500 mM KCl, 0,5 % Tween-20;

\*\*– Фермент должен быть неактивным при 60С в течение 15 минут.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.

**Условия проведения ПЦР**

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

<b>Ревертирование*</b>	<b>60°C**</b>	<b>15 мин</b>
<b>Начальная денатурация</b>	<b>95°C***</b>	<b>5 мин</b>
40-45 циклов	95°C	15 секунд
	60°C (детекция)	30 секунд
	67°C	15 секунд.
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

\*При данных условиях линейный диапазон ревертирования наблюдается от 10 до 10<sup>7</sup> копий RNA фага MS2 в реакции (r<sup>2</sup>=0.998, E=97%).

\*\*Фермент **PyroPro** проявляет максимальную активность при 72-77°C. Использование данной температуры для ревертирования ограничивается Taq-полимеразой (не должна активироваться при данных температурах) и олигонуклеотидами (должны иметь высокий Tm).

\*\*\* Уменьшение времени денатурации может привести к ингибированию ПЦР за счет наличия вытесняющей активности у фермента **PyroPro**.