

Flash ДНК-полимераза

Руководство по применению

	Каталожный №	Комплектация
<input type="checkbox"/>	FL-01/00	Flash ДНК-полимераза (2 ед/мкл), 0,5 мл
<input type="checkbox"/>	FL-05/00	Flash ДНК-полимераза (2 ед/мкл), 2 x 1,25 мл
<input type="checkbox"/>	FL-01/01	– Flash ДНК-полимераза (2 ед/мкл), 0,5 мл; – 2,5-кратный буфер Flash, 8 x 1,25 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 1,25 мл
<input type="checkbox"/>	FL-05/01	– Flash ДНК-полимераза (2 ед/мкл), 2 x 1,25 мл; – 2,5-кратный буфер Flash, 50 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 5 x 1,25 мл

ООО «АртБиоТех»

Тел.: +375 29 264 64 40
mail@qpcr.by

220141, Республика Беларусь
г. Минск, ул. Купревича, д.1, к.3, пом.8, каб.306

1. Описание

Flash ДНК-полимераза представляет собой химерный термостабильный белок, состоящий из Pfu ДНК-полимеразы и ДНК-связывающего домена. ДНК-связывающий домен стабилизирует комплекс ДНК-полимеразы с матрицей, что приводит к повышению процессивности, скорости синтеза, точности и устойчивости фермента к высокой ионной силе раствора. Кроме того, Flash ДНК-полимераза обладает повышенной резистентностью к ингибиторам и может быть использована в «прямом» ПЦР без предварительной очистки матрицы (устойчива к 10 % крови). Фермент не ингибируется дУТФ.

Flash ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу растущей цепи; обладает корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью; не имеет 5'-3'-экзонуклеазной активности.

Flash ДНК-полимераза обладает повышенной скоростью синтеза ДНК (до 4 000 п.о./мин) и способна амплифицировать фрагменты длиной более 10 000 п.о.

Для удобства пользователей Flash ДНК-полимераза выпускается в нескольких комплектациях: как самостоятельный реагент либо в комплекте с 2,5-кратным буфером Flash,

состав которого оптимизирован для амплификации ДНК в стандартных условиях, а также раствором 50 мМ MgCl₂ для оптимизации условий амплификации.

ВНИМАНИЕ!!! В поставляемый буфер Flash входят дНТФ в концентрации 0,2 мМ и MgCl₂ в концентрации 2 мМ (в 1-кратном буфере). В большинстве случаев эти концентрации являются оптимальными.

2. Область применения

- Высокоточная ПЦР;
- Амплификация длинных фрагментов;
- «Прямая» ПЦР (без предварительной очистки матрицы).

3. Стандартный протокол использования Flash ДНК-полимеразы

Для уменьшения ошибки пипетирования при постановке нескольких параллельных реакций рекомендуется приготовить общий ПЦР-премикс, содержащий все компоненты смеси (воду, буфер, ДНК-полимеразу, праймеры) за исключением ДНК-матрицы. Объем ПЦР-премикса рассчитывается исходя из числа реакций с добавлением одного дополнительного образца. После того, как аликваты ПЦР-премикса будут внесены в предварительно промаркированные ПЦР-пробирки, в них добавляют соответствующую ДНК-матрицу.

1. Перед использованием разморозить и тщательно перемешать все компоненты ПЦР-смеси.

2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 1. Количество вносимых компонентов приведено для одной реакции объемом 25 мкл.

Таблица 1. Состав реакционной смеси объемом 25 мкл

Компонент	Объем	Конечная конц.
2,5-кратный буфер Flash	10 мкл	1-кратный
Прямой праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Обратный праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
ДНК-матрица	Определяется пользователем	0,04 нг/мкл – 4 нг/мкл
Flash ДНК-полимераза (2 ед/мкл)	0,25 мкл	0,02 ед/мкл
H ₂ O	Довести объем реакционной смеси до 25 мкл	

В зависимости от особенностей используемой ДНК-матрицы и задач исследования, состав реакционной смеси может быть оптимизирован:

- оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,05–1 мкМ;
- на одну реакцию объемом 25 мкл рекомендуется использовать 1 пг – 10 нг плазмидной, фаговой или бактериальной ДНК;
- концентрация Flash ДНК-полимеразы может варьироваться в пределах 0,02–0,04 ед/мкл.

Допускается использование праймеров с другой начальной концентрацией.

Рекомендуемый объем ПЦР-смеси для одной реакции – 25 мкл. Однако при необходимости объем реакционной смеси может быть изменен с сохранением конечной концентрации входящих в нее компонентов.

3. Аккуратно перемешать реакционную смесь и осадить капли со стенок пробирки.

4. Провести ПЦР.

Рекомендуемые условия амплификации для анализа ПЦР-продуктов с применением гелеэлектрофореза представлены в таблице 2.

Таблица 2. Рекомендуемые условия амплификации

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	98 °С	30 с	1
Денатурация	98 °С	5 с	25–35
Отжиг праймеров	55–67 °С*	10 с	
Элонгация	72 °С	15–30 с на каждую 1 000 п.о.	
Финальная элонгация	72 °С	5 минут	1
Хранение	4 °С	∞	1

* – в зависимости от температуры плавления праймеров

4. Условия хранения и транспортировки

Буфер для хранения и разведения:

20 мМ Трис-НСl (рН 8,0); 100 мМ КСl; 0,1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТТ; 50 % глицерин; 1 % Tween-20.

Транспортирование Flash ДНК-полимеразы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 30 °С (до 5 суток) или при температуре +4 °С (до 30 суток).

Flash ДНК-полимераза хранится при –20 °С.

Срок годности – 1 год.

ООО «АртБиоТех»

Тел.: +375 29 264 64 40
mail@qpcr.by

220141, Республика Беларусь
г. Минск, ул. Купревича, д.1, к.3, пом.8, каб.306