Cloning DNA Polymerase

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Cloning DNA Polymerase	SY550631	SY550632
Cloning (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Cloning	1,8 ml	2 x 1,8 ml
25 mM $MgCl_2$	1,8 ml	2 x 1,8 ml

Transport produktów Cloning przebiega w temperaturze pokojowej, a przechowywanie – w temperaturze -20°C.

Opis komponentów

Cloning DNA Polymerase to rekombinowana termostabilna polimeraza Pfu pochodząca z *Pyrococcus furiosus*.

Enzym wykazuje wyjątkowo niski współczynnik popełnianych błędów podczas dołączania nukleotydów do powstającej nici DNA. 1 U enzymu katalizuje przyłączenie 10 nmoli dNTP do powstającej nici DNA w kierunku od 5' do 3' w czasie 30 minut w temperaturze 70°C. Dodatkowo Cloning DNA Polymerase posiada aktywność egzo-nukleazową w kierunku od 3' do 5', tzw. *proofreading*. Enzym pozostawia amplifikowanym fragmentom tępe końce, dzięki czemu nadają się one do bezpośredniego klonowania.

Bufor reakcyjny Cloning zawierający $MgSO_4$ optymalizuje przebieg reakcji, a zastosowanie $(NH_4)_2SO_4$ zwiększa dodatkowo specyficzność amplifikacji.

Procedura:

Wszystkie kroki procedury należy wykonywać na mokrym lodzie.

1. Wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić, zworteksować i zwirować.
2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA.
   Mastermiks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

Składnik mastermiksu	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
Cloning (5 U/ul)	0,25-0,5 ul	1,25-2,5 U
10x Bufor	5 ul	1x
10 mM dNTP Mix	1-2,5 ul	200-500 uM
10 uM Primer F	1,5-5 ul	0,3-1 uM
10 uM Primer R	1,5-5 ul	0,3-1 uM
Matrycowe DNA	< 500 ng	<10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 50 ul	-
Objętość reakcji	**50 ul**	**-**

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do probówek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej probówki i wymieszać pipetując.
   Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie zalecamy przekraczania 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte probówki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję ze wstępną denaturacją. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Wstępna denaturacja	95°C	3-5 min.	
Denaturacja	95°C	30-60 sek.	
Annealing	50-68°C	30-60 sek.	25-35 cykli
Elongacja	72°C	1-4 min.*	
Końcowa elongacja	72°C	5-10 min.	
Schłodzenie	4-10°C	∞	

* Czas elongacji zależy od długości produktu. Przyjmuje się około 1 min./1 kb.

7. W termocyklerze włączyć pokrywę grzejną na temperaturę >95°C. W termocyklerach nieposiadających pokrywy grzejnej próbki należy pokryć olejem mineralnym.

Dalsze procedury

Próbki po reakcji można przechowywać do 8h w temperaturze +4°C (wliczając w ten okres czas inkubacji w temp. 4-10°C w termocyklerze) lub zamrozić w -20°C w celu dłuższego przechowywania.

W celu analizy elektroforetycznej próbki po reakcji należy obciążyć poprzez wymieszanie z koncentratem buforu obciążnikowego (np. 6x Syngen Blue Loading Dye SY521051, 6x Syngen Orange Loading Dye SY521061) i nakładać na żel agarozowy do długich fragmentów (np. Syngen Daily Agarose SY521012).

Do izolacji prążków z żelu agarozowego można zastosować zestawy kolumienkowe (np. Syngen Gel Mini Kit SY201210, Syngen Gel ME Mini Kit SY201410).

Produkty PCR nadają się do bezpośredniego oczyszczania przy pomocy zestawów kolumienkowych (np. Syngen PCR Mini Kit, SY 201110, Syngen PCR ME Mini Kit SY201310) oraz poprzez rozdział w agarozie low melting (np. Syngen Low Melting Agarose SY521013).

Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl