

## 1. ОПИСАНИЕ

Фьюжн ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную **Pfu**-полимеразу, слитую с **Sso7d** ДНК-связывающим доменом. Такой вариант полимеразы дольше остается связанным с ДНК-матрицей во время синтеза, поэтому Фьюжн полимеразы позволяет амплифицировать ДНК быстрее, чем **Pfu**-полимераза дикого типа, сохраняя низкую частоту ошибок. Фермент получен в штамме **E.coli**, молекулярная масса **100.2** кДа

## 2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

---

## 1. ПОДГОТОВКА РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

Смешайте компоненты согласно Таблице 1. Если объем реакции мал (<50 мкл), для снижения погрешности полимеразу можно предварительно развести в 1X реакционном буфере. Аккуратно перемешайте смесь переливанием или легким покачиванием.

Компонент	Реакционная смесь, 50 мкл	Конечная концентрация
<b>5X РЕАКЦИОННЫЙ БУФЕР</b>		
	10 мкл	
<b>1X</b>		
<b>10 ММ DNTP</b>		
	1 мкл	
<b>200 мкМ</b>		
<b>ПРАЙМЕРЫ, 10 МКМ</b>		
	по 1 мкл каждого	
<b>0.5 мкМ</b>		
<b>ДНК МАТРИЦА</b>		
	-	
<b>1 пг - 10 нг (плазмидная ДНК) 10-250 нг (геномная ДНК)</b>		
<b>ФЬЮЖН ПОЛИМЕРАЗА</b>		
	0.5 мкл	
<b>0.5 ед. на 50 мкл реакции</b>		
<b>ВОДА MQ</b>		
	до 50 мкл	
	-	

Таблица 1. Состав реакционной смеси для высокоточного ПЦР

## 2. ТЕМПЕРАТУРНАЯ ПРОГРАММА

Перенесите пробирку с готовой реакционной смесью в амплификатор (термоциклер) и запустите программу ПЦР в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 2.

Этап	Температура, °C	Время
<b>ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ</b>		
	96-98	
	<b>30-60 сек</b>	
<b>25-35 ЦИКЛОВ</b>		
Денатурация		
	96-98	
	<b>10 сек</b>	
<b>ОТЖИГ</b>		
	50-72	
	<b>15 сек</b>	
<b>ЭЛОНГАЦИЯ</b>		
	72	
	<b>15-30 сек / 1 тыс. п.о.</b>	
<b>ФИНАЛЬНАЯ ЭЛОНГАЦИЯ</b>		
	72	
	<b>1-10 минут</b>	
<b>ХРАНЕНИЕ</b>		
	4	
	<b>∞</b>	

Таблица 2. Пример стандартной программы температурного циклирования

### 3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Для расчета температуры отжига ( $T_m$ ) используйте наш [калькулятор  \$T\_m\$](#) .
- Стандартная рабочая температура —  $98^\circ\text{C}$ . Она обеспечивает полное разделение цепей даже на сложных участках без повреждения самого фермента.
- Рекомендуем использовать следующее количество ДНК на реакцию:  
Геномная ДНК (клетки млекопитающих, растения, грибы): 50–250 нг  
Геномная ДНК (бактерии, дрожжи): 1–10 нг  
Плазмидная ДНК: 1 пг – 10 нг
- Избыток матрицы может привести к появлению неспецифических продуктов (шлейфа)
- Если содержание GC в ампликоне превышает 65%, рекомендуется добавление DMSO (2–8%) для облегчения плавления вторичных структур.

### 4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

#### 50 ЕД.

- 1 пробирка: 50 мкл Фьюжн полимеразы;
- 1 пробирка: 1,5 мл реакционного буфера (5x)

#### 250 ЕД.

- 1 пробирка: 250 мкл Фьюжн полимеразы;
- 4 пробирки по 1,5 мл реакционного буфера (5x)

## 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ

### АКТИВНОСТЬ

1 ед./мкл

## 6. СОСТАВ РАСТВОРОВ

5X Реакционный буфер содержит 10 mM  $MgCl_2$ .

## 7. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За одну единицу активности принято количество фермента, необходимое для включения 20 нмоль dNTP в кислотонерастворимую фракцию ДНК за 30 мин при 74°C.

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности 3 года. Хранить при температуре -20°C. Для реакционного буфера избегать многократных циклов замораживания и размораживания. Рекомендуется сделать аликвоты реакционного буфера для однократного использования.

## Подтверждение активности

 Подтверждение активности

Рисунок 1. Амплификация фрагментов величины до 10 т.п.о. М – маркер длин ДНК 1 кб

 Подтверждение активности

Рисунок 2. Амплификация матриц с разным GC составом. М – маркер длин ДНК 1 кб

## Решение проблем

### ● Отсутствие или низкий выход продукта

- **Неоптимальная температура отжига ( $T_m$ ):** используйте градиент температуры для подбора оптимальной. Попробуйте увеличить время отжига праймеров до 30 секунд.
- **Недостаточная денатурация:** для сложных матриц увеличьте время предварительной денатурации до 2-3 минут или время денатурации в цикле до 15-20 секунд.
- **Короткое время элонгации:** для фрагментов >5 т.п.о. или сложных матриц используйте расчет 30 сек/т.п.о.
- **Проблемы с матрицей:** проверьте концентрацию и чистоту ДНК (отсутствие фенола, этанола, высоких концентраций EDTA). Избыток матрицы может ингибировать реакцию.

### ● Неспецифическая амплификация (лишние полосы)

- **Слишком низкая  $T_m$ :** используйте температурный градиент для подбора оптимальной температуры отжига.
- **Время отжига:** попробуйте уменьшить время отжига до 10 секунд.
- **Избыток циклов амплификации:** попробуйте уменьшить количество циклов до 25–30. Также в некоторых случаях помогает уменьшение объема полимеразы до 0.25 мкл на 50 мкл реакции.
- **Концентрация праймеров:** избыток праймеров (>0.5 мкМ) может приводить к неспецифической амплификации. Оптимизируйте их количество.

## ● Шмер на геле

- **Избыток циклов:** слишком большое количество циклов приводит к накоплению побочных продуктов и реассоциации ДНК.
- **Слишком много ДНК-матрицы:** высокая концентрация ДНК может вызвать неспецифическое связывание праймеров по всей длине.
- **Деградация матрицы:** убедитесь, что исходная ДНК не фрагментирована.
- **Слишком длинная элонгация:** сократите время до 15 сек/т.п.о. Избыточное время работы фермента может привести к деградации продукта за счет 3'→5' экзонуклеазной активности.

## ● Проблемы со сложными фрагментами (GC-богатые или >5 т.п.о.)

- **Вторичные структуры:** при содержании GC>65% добавьте в реакцию DMSO (2–8%). Это поможет «плавлению» сложных участков.
- **Дизайн праймеров:** для длинных фрагментов выбирайте праймеры длиной 24–30 нуклеотидов с высокой Tm (>65 °C), чтобы проводить отжиг и элонгацию при близких температурах (двухстадийный ПЦР).