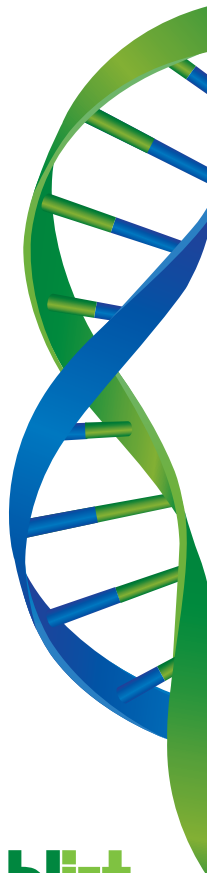


Hypernova

Polimeraza DNA



Hypernova

Polimeraza DNA

Polimeraza DNA **Hypernova** jest rekombinowaną, termostabilną polimerazą DNA *Pwo* pochodzącą z archeona *Pyrococcus woesei*. Polimeraza pozwala na tworzenie bardzo dużych amplikonów (powyżej 10 kpz). Polimeraza DNA **Hypernova** jest bardzo wszechstronną i łatwą w użyciu polimerazą, pracującą nadzwyczaj wydajnie w różnych warunkach. Można nią zastąpić inne polimerazy bez konieczności czasochłonnej optymalizacji warunków reakcji PCR.

Hypernova katalizuje reakcję replikacji DNA w temp. 72°C. W temperaturze 95°C czas półtrwania tej polimerazy wynosi ponad 8 godzin. Wykazuje aktywność 3'→5' egzonukleazy (tzw. aktywność korektorską). Brak aktywności 5'→3' egzonukleazy zwiększa trwałość produktów PCR. Pozostawia tępo-zakończone końce 3' (istotne m.in. przy klonowaniu molekularnym).

Sz szczególnie polecana do przeprowadzania reakcji multiplex PCR, gdyż wykazuje szerszy zakres tolerancji na stężenia Mg^{2+} , soli i pH. Ze względu na wyjątkową termostabilność, **Hypernova** jest polecana do amplifikacji długich fragmentów DNA oraz trudnych matryc (rejonów bogatych w pary GC, palindromów, powtórzeń), szczególnie w przypadkach, gdy wymagana jest wysoka czułość i długie czasy reakcji. Polimeraza **Hypernova** zachowuje 95% swojej aktywności nawet po ponad 2-godzinnej reakcji PCR.



Właściwości i zalety

- Wysoka procesywność (amplifikacja długich matryc)
- Wysoka wydajność amplifikacji DNA
- Wysoka wierność reakcji PCR (aktywność korektorska)
- Idealna do amplifikacji trudnych matryc (np. bogatych w pary GC)
- Niezawodna w reakcjach multiplex PCR
- Podwyższona specyficzność i czułość
- Bardziej termostabilna niż polimeraza *Taq*

Zastosowania

- Powtarzalna amplifikacja długich matryc (long range PCR)
- Multiplex PCR
- Klonowanie, mutageneza miejscowo-specyficzna i inne metody wymagające dużej wierności
- Amplifikacja trudnych matryc DNA (np. bogatych w pary GC)

Hypernova

Polimeraza DNA

Przygotowanie reakcji PCR

1. Rozmrozić odczynniki, dokładnie wymieszać, a następnie krótko zwirować.
2. Dodać następujące składniki mieszaniny do sterylnej, wolnej od nukleaz próbówki PCR w kolejności zamieszczonej w tabeli poniżej.

Składnik	Sugerowana ilość na reakcję	Dopuszczalne stężenie końcowe w mieszaninie reakcyjnej
10x <i>Hypernova</i>	5 µl	1x
8 mM dNTPs Mix	5 µl	0,2–0,25 mM każdego dNTP
50 mM MgCl ₂	2 µl	2–5 mM
starter Forward (10 µM)	1 µl	0,1–1,0 µM
starter Reverse (10 µM)	1 µl	0,1–1,0 µM
matrycowe DNA	1–100 ng	10 pg–0,5 µg
polimeraza DNA <i>Hypernova</i>	1 U	1–2 U
woda (PCR-grade)	dodać do 50 µl	

3. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną należy wymieszać przez pipetowanie lub worteckowanie i krótko zwirować.
4. Następnie umieścić w bloku grzejnym termocyklera i prowadzić reakcję PCR.



5. W poniższej tabeli zamieszczono sugerowany profil temperaturowo-czasowy.

Etap	Temperatura	Czas	
Denaturacja wstępna	95°C	1–5 min ⁽¹⁾	
Denaturacja	95°C	30 s	
Przyłączanie starterów	45–65°C ⁽²⁾	30 s	30–40 cykli ⁽⁴⁾
Wydłużanie	72°C	30 s–10 min ⁽³⁾	
Wydłużanie końcowe	72°C	1–3 min	
Chłodzenie	4°C	∞	

- 1) Czas denaturacji wstępnej zależy od zawartości par GC w obrębie amplifikowanego regionu i rodzaju matrycy DNA. Dla matryc takich jak plazmidowe DNA i cDNA zaleca się stosowanie krótszych czasów etapu denaturacji wstępnej (1–2 min). Dla bardziej kompleksowych matryc (np. eukariotyczne genomowe DNA), wymagane są dłuższe czasy denaturacji wstępnej (3–5 min).
- 2) Temperatura przyłączania starterów zależy od sekwencji DNA oraz ich temperatury topnienia. Optymalna temperatura przyłączania jest zwykle niższa o 2–5°C niż średnia temperatura topnienia pary starterów.
- 3) Czas elongacji zależy od długości amplifikowanego fragmentu DNA. Zaleca się stosować 1 minutę na każde 1000 pz produktu PCR.
- 4) Liczba cykli zależy od liczby kopii amplifikowanego fragmentu DNA. W przypadku małych ilości matrycy DNA należy zwiększyć liczbę cykli do 40.

Dodatkowe informacje

Oba dołączone bufor reakcyjne mogą być testowane z polimerazą *Hypernova* w celu określenia najbardziej odpowiednich warunków do konkretnego zastosowania. Bufor **10x Hypernova** zalecany jest jako "bufor pierwszego podejścia" oraz do zastosowań wymagających wysokiej specyficzności. Natomiast bufor **10x Shark** zalecany jest do zastosowań, w których wymagana jest wysoka czułość i wydajność amplifikacji (np. do jednoczesnej amplifikacji wielu fragmentów DNA).

Możliwe problemy i ich rozwiązywanie

Problemy, które mogą wystąpić podczas nastawiania reakcji PCR i analizy wyników, ich przyczyny oraz sugerowane rozwiązania są opisane na stronie: www.blirt.eu.

Bufor do przechowywania

20 mM Tris-HCl (pH 7,4 w 25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 50% (v/v) glicerol

Bufory reakcyjne

10x *Hypernova*

100 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25°C), 500 mM KCl, 1,5% Triton X-100

10x *Shark*

200 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25°C), 100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0% Triton X-100

Definicja jednostki

Jedna jednostka to ilość enzymu wystarczająca do przyłączenia 10 nmoli deoksynukleotydów do nierozpuszczalnej frakcji DNA w czasie 30 min w 72°C w 50 µl reakcji.

Kontrola jakości

Preparat wolny od DNaz. Szczegółowo testowany w różnorodnych reakcjach PCR.

Polimeraza DNA *Hypernova*

Zawartość	RP232 200 U	RP235 1000 U	RP232-S 20 U
<i>Hypernova</i> 2 U/μl Polimeraza DNA	100 μl	500 μl	10 μl
10x <i>Hypernova</i> Bufor reakcyjny	1.25 ml	4 x 1.25 ml	100 μl
10x <i>Shark</i> Bufor reakcyjny	1.25 ml	4 x 1.25 ml	100 μl
50 mM MgCl₂	1 ml	4 x 1 ml	80 μl


Przechowywanie i transport

Warunki przechowywania

Przechowywać w temp. -20°C.

Warunki transportu

Transport w warunkach chłodniczych.

 do badań naukowych

Data ważności

Informacja na etykiecie