

**Na štítku výrobku zkontrolujte aktuální katalogové číslo, šarži a datum spotřeby.**

## phi29 DNA polymeráza, 10 u/μl

CAT.#	VELIKOSTKOMPONENTY	SLOŽENÍ SOUČÁSTI
u/μl	IDE01011000 u 0,5 ml - 10x pufr phi29	Pufr pro skladování enzymů obsahuje stabilizátory a 50% glycerol. 10X phi29 Buffer obsahuje 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> a další látky.
u/μl	IDE01055000 u 5 x 1000 u - DNA polymeráza phi29, 10 5 x 0,5 ml - 10X pufr phi29	komponenty.

Úložisko Ve tmě při -20 °C.

### APLIKACE

- Izotermická amplifikace DNA pro sekvenování, klonování
- RCA - zesílení valivého cyklu
- MDA - vícenásobné zesílení posunu
- WGA - amplifikace celého genomu
- Amplifikace DNA s proteinovým nebo RNA primerem

### PODROBNOSTI O PRODUKTU

Rekombinantní DNA polymeráza phi29 je klasický enzym určený pro použití v běžných aplikacích izotermické amplifikace DNA, které se provádějí při mírné teplotě na základě aktivity vytěšňování vláken. Enzym je dodáván s optimalizovaným vysoce účinným pufrům. Uživatel musí přidat dNTP, templát a primery. Polymeráza phi29 má silnou aktivitu vytěšňování vláken a účinnou 5' - 3' polymerázovou aktivitu, pracuje při teplotě přibližně 4 - 35 °C a syntetizuje DNA z malého množství až po enormní výtěžek až po viditelně zvýšenou viskozitu reakční směsi. Enzym nemá 5' - 3' exonukleázovou aktivitu, ale má silnou 3' - 5' exonukleázovou (korekturní) aktivitu a může degradovat primery, proto se obecně doporučuje používat 3' chráněné exo-rezistentní primery. Enzym lze tepelně inaktivovat, toleruje dUTP a vytváří DNA s tupým koncem.

### VÝHODY

- Amplifikace DNA s vysokou výtěžností při konstantní teplotě 30 °C
- Robustní polymeráza se silnou aktivitou posunu vláken
- Vysoká zpracovatelnost, syntéza více než 70 kb dlouhých kmenů DNA
- Vysoká věrnost, nízká chybovost při sekvenování a klonování
- Klasické složení enzymu a pufru pro známé aplikace phi29

### TECHNICKÉ VLASTNOSTI

Nejdůležitější technické vlastnosti DNA polymerázy phi29 (na základě hojně dostupné vědecké literatury):

- Silná aktivita posunu vláken
- 5' - 3' polymerázová aktivita na DNA templátech (a na RNA templátech)
- Silná 3' - 5' (proofreading) exonukleázová aktivita degraduje nechráněné primery
- Žádná 5' - 3' exonukleázová aktivita
- Optimální reakční teplota je 30 °C
- Rozsah pracovních teplot je 4 - 35 °C, v závislosti na aplikaci.
- Optimální reakční doba závisí na aplikaci
- Enzym je inaktivován za 10 minut při teplotě 65 °C.
- Dokáže prodloužit primery DNA i RNA
- Přidání pyrofosfatázy může reakci urychlit

*Použití tohoto výrobku v určitých aplikacích, některé pufrovací přísady nebo určité protokoly mohou být předmětem patentů. Uživatel musí analyzovat všechny příslušné licence na označení omezeného použití a může potřebovat licenci.*

### ENZYM USAGE POKYNY

- Pokyny pro použití jsou pouze velmi obecné. Před použitím enzymu postupujte podle speciálního aplikačního protokolu z dostupných literárních zdrojů, analyzujte všechny související platné licence a patenty.
- Přijměte typická opatření k zabránění kontaminace, udržujte stůl v čistotě, používejte rukavice, sterilní zkumavky a filtrační pipety.
- Zahrňte paralelně kontrolu bez šablony a pozitivní kontroly.
- Reagencie rozmrazte a uchovávejte v ledu. Před použitím je dobře promíchejte.
- Proveďte denaturaci / žíhání primerů zahřátím reakce na 95 °C a jejím rychlým ochlazením. Teprve poté přidejte polymerázu phi29 a zahajte syntézu.
- Reakci provádějte při 30 °C. V případě potřeby optimalizujte reakční teplotu v rozmezí 4-35 °C pro každý systém templát/primer.
- Doporučená reakční doba je 60 až 360 minut. U některých cílů s nízkým počtem kopií může být nutná inkubace přes noc.
- Hojný amplifikační produkt může zvýšit viskozitu roztoku, dobře jej promíchejte a v případě potřeby naředte pro následné aplikace.

Příklad pro množství enzymu a pufru pro přípravu 20 μl reakce:

10X pufr phi29	1 μl
100 μM Primery (např. exo-rezistentní náhodný hexamer, závisí na aplikaci)	1 μl
Šablona DNA (variabilní, závisí na aplikaci)	1 μl (od 1 do 10 ng)
Voda pro PCR	do 10 μl
✓ Míchejte opatrně, aby nevznikaly bubliny.	
✓ Umístěte do termostatu nebo qPCR přístroje a annealujte primery:	
Denaturace/vyžhání primerů	95 °C - 3-5 min
Chlazení na ledu nebo v cykléru	4°C - 2-3 min
Přidejte 10 mM dNTP Mix (#NUM0201)	1-2 μl
Přidejte 10X pufr phi29 (druhá část)	1 μl
Přidejte barvivo 50X vhodné pro qPCR (volitelné pro qPCR).	0,4 μl
Přidejte vodu PCR (#WAT0110)	do 19 μl
Přidání DNA polymerázy phi29	1 μl
✓ Promíchejte a inkubujte pro syntézu DNA při 30 °C po dobu 1-6 hodin.	
✓ Enzym lze inaktivovat za 10 minut při 65 °C.	
✓ Reakce skladujte krátkodobě při +4, dlouhodobě při -20 °C.	