



# Инструкция по применению

## Genta HS-Pfu ДНК-полимераза

Термостабильная Pfu ДНК-полимераза

Версия 1 от 11.04.2023

### 1. ОПИСАНИЕ

Genta HS-Pfu ДНК-полимераза является высокоточным термостабильным ферментом с молекулярной массой около 90 кДа, выделенным из *Pyrococcus furiosus*. Genta HS-Pfu обладает 5' → 3' полимеразной активностью и корректирующей 3' → 5' экзонуклеазной активностью, которая быстро устраняет неправильное включение оснований в ходе репликации матрицы.

Поэтому ДНК-полимераза HS-Pfu рекомендуется для использования в реакциях, которые требуют высокоточного синтеза. В результате амплификации образуются продукты ПЦР с тупыми концами.

Длина амплифицируемых фрагментов – до 7 000 п.н. Genta HS-Pfu ДНК-полимераза включает при амплификации дУТФ, поэтому можно использовать в реакции ПЦР урацил-содержащие праймеры или матрицы.

Genta HS-Pfu ДНК-полимераза инаktivирована с помощью химической модификации, что позволяет проводить приготовление реакционной смеси при комнатной температуре. Наличие «горячего старта» повышает специфичность и чувствительность амплификации. Активация полимеразы происходит при её прогревании до 98°C в течение 7 минут или до 95°C в течение 15 минут.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего ген ДНК-полимеразы из *Pyrococcus furiosus*.

### 2. СОСТАВ

Компоненты	RP-E-019-S	RP-E-019-L	RP-E-019-X (под заказ)
Genta HS-Pfu ДНК-полимераза, 5 000 ед./мл	0,2 мл	5 x 0,2 мл	XXX мл
5x Genta ПЦР-буфер	2 x 1,25 мл	10 x 1,25 мл	-

### 3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Рутинная ПЦР ДНК-фрагментов до 7 000 п.н.
- Высокоспецифичная ПЦР



## Инструкция Genta HS-Pfu ДНК-полимераза

Версия 1  
от 11.04.2023  
Стр 2

### 4. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Приготовление реакционной смеси можно проводить на рабочем столе.
2. Фермент следует добавлять в реакционную смесь последним, чтобы избежать деградации праймеров в отсутствие дНТФ.
3. Для минимизирования возможной ошибки пипетирования рекомендуется приготовить реакционную смесь, содержащую все компоненты, в расчете на нужное количество реакций плюс одна.
4. Состав реакционной смеси:

Компонент	На 25 мкл реакции	На 50 мкл реакции	Конечная концентрация
5-кратный ПЦР-буфер	5 мкл	10 мкл	1-кратный (2 мМ MgSO <sub>4</sub> )
10 мМ смесь дНТФ (50x)	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мМ каждого
Прямой праймер, 10 мкМ	1 мкл	2 мкл	0,4 мкМ
Обратный праймер, 10 мкМ	1 мкл	2 мкл	0,4 мкМ
ДНК-матрица	X мкл	X мкл	10 пг – 200 нг
Genta HS-Pfu ДНК-полимераза	0,25 мкл	0,5 мкл	0,05 ед/мкл
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

5. После приготовления реакционной смеси пробирки поместить в амплификатор, предварительно нагретый до 98°C. Если в амплификаторе отсутствует нагревающаяся крышка, то в каждую пробирку необходимо добавить каплю минерального масла.
6. Условия термоциклирования:

Шаг	Протокол 1 (с отжигом праймеров)		Протокол 2 (без отжига праймеров)		Количество циклов
	Температура	Время	Температура	Время	
Предварительная денатурация // активация Genta HS-Pfu	98°C*	7 мин	98°C	7мин	1
Денатурация	98°C	10 сек	98°C	10 сек	25 - 35
Отжиг	50-68°C**	10 – 30 сек	--	--	
Элонгация	72°C	30 - 60 сек / 1 т.п.н.	72°C	30 - 60 сек / 1 т.п.н.	
Элонгация финальная	72°C	5 – 10 мин	72°C	5 – 10 мин	1



\* Для некоторых ДНК-матриц предпочтительнее амплификация с денатурацией при 95°C.

\*\* температура отжига зависит от структуры праймеров

7. При температуре плавления праймеров ниже 68°C рекомендуется проводить амплификацию по Протоколу 1. Если температура отжига праймеров выше 68°C, то предпочтительнее использовать для амплификации Протокол 2

## 5. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

### ▪ Фермент

Рекомендуемое количество Genta HS-Pfu на реакцию – 1,25 единицы на 25 мкл реакции. При амплификации длинных и сложных матрицы увеличение количества фермента до 2,5 – 5 единиц на реакцию может улучшить выход ПЦР.

### ▪ ДНК-матрица

Оптимальное количество ДНК на 50 мкл реакции 10 пг – 1 нг для плазмид и фаговой ДНК, 100 нг – 1 мкг для геномной ДНК.

При проведении ПЦР GC-богатых ДНК матриц рекомендуется проводить реакцию в присутствии 7-10% DMSO.

### ▪ Mg<sup>2+</sup>

Стандартный 5-кратный ПЦР-буфер содержит 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, что соответствует 2 мМ MgSO<sub>4</sub> в реакционной смеси. При необходимости подбора концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> в реакционной смеси можно использовать ПЦР-буфер без солей магния и 100 мМ раствор сульфата магния.

### ▪ Дезоксинуклеотиды

Финальная концентрация каждого дезоксинуклеотида в реакционной смеси обычно составляет 200 мкМ.

### ▪ Праймеры

Праймеры для ПЦР обычно имеют длину 15-30 нуклеотидов. Оптимальное содержание GC в праймере - 40-60 %. Компьютерные программы могут быть использованы для дизайна и анализа праймеров. Разницы температур плавления между двумя праймерами не должна превышать 5°C. Финальная концентрация каждого праймера в реакционной смеси может составлять 0,1 – 1 мкМ.



## 6. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

- **Денатурация**

Genta HS-Pfu полимеразы требует предварительного прогрева 98°C в течение 7 минут. В процессе термоциклирования рекомендована денатурация при 98°C в течение 10 сек. Для чистых проб возможна амплификация с денатурацией при 95°C. Тогда фермент требует предварительного прогрева в течение 15 мин при 95°C, а в процессе термоциклирования рекомендуемое время денатурации составляет 15 сек.

- **Отжиг**

При температуре плавления праймеров ниже 68°C рекомендуется включать данный шаг в цикл ПЦР. Этап отжига обычно составляет 10–30 секунд. Температура отжига зависит от T<sub>пл</sub> (температуры плавления) пары праймеров и обычно составляет 45–68°C. Температуру отжига можно оптимизировать, выполнив ПЦР с температурным градиентом, начиная на 5°C ниже расчетной T<sub>пл</sub>.

- **Элонгация**

Рекомендуемая температура элонгации – 72°C. Время элонгации для большинства ДНК-матриц составляет 30 сек на каждую тыс. п.н., но может быть увеличено до 1 мин на тыс п.н. Рекомендована финальная элонгация при 72°C в течение 5-10 мин.

## 7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Температура хранения: - 20°C.

Условия транспортировки: в термоконтейнере с хладоэлементами, при температуре от 2°C до 8°C не более 7 суток.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки: 24 месяца с момента производства.

# СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

✓ **Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность**

Инкубация 10 ед. фермента с 1 мкг лямбда ДНК/Hind III при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимой деградации фрагментов ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **Неспецифическая эндонуклеазная активность**

Инкубация 25 ед. фермента с 1 мкг ДНК рUC19 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **РНКазная активность**

Инкубация 10 ед. фермента с флуоресцентным РНК-субстратом при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **Чистота белка (SDS-ПААГ)**

Genta HS-Pfu имеет чистоту  $\geq 99\%$ , определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

✓ **Функциональное тестирование**

Аmplификация фрагментов разной длины (200 – 7 000 п.н.) с последующей детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (с зондами/интеркалирующим красителем) и методом агарозного гель-электрофореза.

***Уважаемый Пользователь!***

*Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!*

*Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем Вам признательны если вы предоставите на обратную связь по адресу [info@genterra.ru](mailto:info@genterra.ru)*