



Инструкция по применению

Genta HS-UltraSP(U)

ДНК-полимераза

Термостабильная Фьюжн ДНК-полимераза

Версия 1 от 02.11.2023

1. ОПИСАНИЕ

Genta HS-UltraSP(U) фьюжн ДНК-полимераза является рекомбинантным белком, состоящим из слитых термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающего домена термофильных архей вида *Sulfolobus solfataricus* (Sso7d). Домен Sso7d связывается с малой бороздкой двуцепочечной ДНК и стабилизирует комплекс полимеразы с ДНК. Благодаря этому Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза, обладает повышенной процессивностью, точностью синтеза и возможностью амплификации длинных фрагментов. Фьюжн ДНК-полимераза обладает 5'→3' полимеразной активностью, 3'→5' экзонуклеазной активностью и синтезирует продукты с тупыми концами.

ДНК-полимераза Genta HS-UltraSP(U) рекомендуется для использования в реакциях, которые требуют высокоточного синтеза. Длина амплифицируемых фрагментов – до 20 000 п.н. Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза включает при амплификации дУТФ, поэтому можно использовать в реакции ПЦР урацил-содержащие праймеры или матрицы.

Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза инактивирована 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 при 98°C в течение 5-7 минут или при 95°C в течение 15 минут.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего ген химерной ДНК-полимеразы из *Pyrococcus furiosus*. Содержит His-tag на N-конце и sso7d-домен на C-конце полипептидной цепи.

2. СОСТАВ

Компоненты	RP-E-029-S	RP-E-029-L	RP-E-029-X
Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза, 2 000 ед./мл	0,2 мл	5 x 0,2 мл	XXX мл
5x Genta SP ПЦР-буфер	2 x 1,25 мл	10 x 1,25 мл	---
GC Энхансер	2 x 1,6 мл	10 x 1,6 мл	---



Инструкция
Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза

Версия 1
от 02.11.2023
Стр 2

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Амплификация длинных ДНК-фрагментов до 20 000 п.н.
- Высокоточная ПЦР
- Сайт-специфический мутагенез

4. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Приготовление реакционной смеси можно проводить на рабочем столе.
2. Для минимизирования возможной ошибки пипетирования рекомендуется приготовить реакционную смесь, содержащую все компоненты, в расчете на нужное количество реакций плюс одна.
3. Состав реакционной смеси:

Компонент	На 25 мкл реакции	На 50 мкл реакции	Конечная концентрация
5-кратный SP ПЦР-буфер	5 мкл	10 мкл	1-кратный (2 мМ MgSO ₄)
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-UltraSP(U) ДНК-полимераза	0,25 мкл	0,5 мкл	0,02 ед/мкл
4X GC Энхансер (опционально)	(6,25 мкл)	(12,5 мкл)	1-кратный
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

4. После приготовления реакционной смеси пробирки поместить в амплификатор.. Если в амплификаторе отсутствует нагревающаяся крышка, то в каждую пробирку необходимо добавить каплю минерального масла.
5. Условия термоциклирования:

Шаг	Протокол 1 (с отжигом праймеров)		Протокол 2 (без отжига праймеров)		Количество циклов
	Температура	Время	Температура	Время	
Предварительная денатурация // активация Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза	98°C*	5 - 7 мин	98°C	5 - 7 мин	1
Денатурация	98°C	10 сек	98°C	10 сек	25 - 35
Отжиг	50-68°C**	10 - 20 сек	--	--	
Элонгация	72°C	30 сек / 1 т.п.н.	72°C	40 сек / 1 т.п.н.	



Инструкция
Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза

Версия 1
от 02.11.2023
Стр 3

Элонгация финальная	72°C	5 мин	72°C	5 мин	1
------------------------	------	-------	------	-------	---

* Для некоторых ДНК-матриц предпочтительнее амплификация с денатурацией при 95°C 15 мин.

** температура отжига зависит от структуры праймеров

- 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-UltraSP(U) на реакцию – 0,5 единиц на 25 мкл реакции. При амплификации длинных и сложных матриц увеличение количества фермента до 1-2 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.

▪ Mg²⁺

5-кратный SP ПЦР-буфер содержит 10 mM MgSO₄, что соответствует 2 mM MgSO₄ в реакционной смеси. При необходимости подбора концентрации ионов Mg²⁺ в реакционной смеси можно использовать ПЦР-буфер без солей магния и 100 mM 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



Инструкция
Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза

Версия 1
от 02.11.2023
Стр 4

- **Денатурация**

Genta HS-UltraSP(U) ДНК-полимераза требует предварительного прогрева 98°C в течение 5 - 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 Тпл (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 Тпл.

- **Элонгация**

Рекомендуемая температура элонгации – 72°C. Время элонгации для большинства ДНК-матриц составляет 30 сек на каждую тыс. п.н. Рекомендована финальная элонгация при 72°C в течение 5 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 4 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 4 ед. фермента с 0,6 мкг ДНК pBR322 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **РНКазная активность**

Инкубация 4 ед. фермента с 50 нг флуоресцентно меченного РНК-субстрата при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **Чистота белка (SDS-ПААГ)**

Чистота препарата белка составляет более 95% по результатам анализа методом гель-электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Coomassie Brilliant Blue.

✓ **Контаминация геномной ДНК *Escherichia coli***

Наличие геномной ДНК *E.coli* проверяли методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (с интеркалирующим красителем) с праймерами, специфичными для локуса 16S рРНК *E.coli*.

✓ **Функциональное тестирование**

Аmplификация фрагментов разной длины (1 000 – 15 000 п.н.) с последующей детекцией продуктов реакции 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 нам обратную связь по адресу info@genterra.ru