



Инструкция по применению

Genta Taq ДНК-полимераза

Taq ДНК-полимераза

Версия 1 от 17.01.2023

1. ОПИСАНИЕ

Genta Taq ДНК-полимераза — рекомбинантный аналог ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Фермент обладает 5'-3' полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью, не обладая при этом корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью. Genta Taq ДНК-полимераза предназначена для использования в большинстве рутинных ПЦР-исследований, в том числе ПЦР в режиме реального времени.

Оптимальная температура работы фермента – 72-74°C. Genta Taq ДНК-полимераза включает при амплификации дУТФ, поэтому можно использовать в реакции ПЦР урацил-содержащие праймеры или матрицы. Длина амплифицируемых фрагментов – до 5 000 п.н.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего ген ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*.

2. СОСТАВ

Компоненты	RP-E-014-S	RP-E-014-L	RP-E-014-X (под заказ)
Genta Taq 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 5 000 п.н.
- Низкокопийная ПЦР
- Мультиплексная ПЦР
- ПЦР с детекцией в режиме реального времени (с зондами, интеркалирующими красителями)

4. БУФЕР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ (1X ПЦР-БУФЕР)

70 мМ Трис/НСl (рН 8.8 при 25°C); 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 4 мМ MgSO₄; 0,01% твин-20; 0,1 мг/мл БСА; 8% глицерин.



5. БУФЕР ДЛЯ ХРАНЕНИЯ

20 мМ Трис/НСl, рН 8.3 (при 25°С); 100 мМ КСl; 0.1 мМ ЭДТА; 50% глицерин; стабилизаторы. При необходимости дальнейшей лиофилизации Genta Taq ДНК-полимераза может быть предоставлена в буфере, не содержащем глицерин.

По желанию заказчика Genta Taq ДНК-полимераза может быть укомплектована буфером без Mg^{2+} или 10 мМ $MgSO_4$ (5х ПЦР-буфер), или по прописи заказчика.

6. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Приготовление реакционной смеси следует проводить на льду (или использовать охлаждённый металлический штатив). Последовательность добавления компонентов не имеет значения.
2. Для минимизирования возможной ошибки пипетирования рекомендуется приготовить реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме ДНК-матрицы, в расчете на нужное количество реакций плюс одна. Внести в пробирки аликвоты реакционной смеси и затем добавить требуемое количество ДНК-матрицы.
3. Состав реакционной смеси:

Компонент	На 25 мкл реакции	На 50 мкл реакции	Конечная концентрация
5-кратный ПЦР-буфер	5 мкл	10 мкл	1-кратный (4 мМ $MgSO_4$)
10 мМ смесь дНТФ (50х)	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 Taq ДНК-полимераза	0,25 мкл	0,5 мкл	0,05 ед/мкл
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

4. После приготовления реакционной смеси пробирки поместить в амплификатор, предварительно нагретый до 95°С. Если в амплификаторе отсутствует нагревающаяся крышка, то в каждую пробирку необходимо добавить каплю минерального масла.



Инструкция Genta Taq ДНК-полимераза

Версия 1
от 17.01.2023
Стр 3

5. Условия термоциклирования:

Шаг	Протокол 1 (с отжигом праймеров)		Протокол 2 (без отжига праймеров)		Количество циклов
	Температура	Время	Температура	Время	
Предварительная денатурация	95°C	30 сек	95°C	30 сек	1
Денатурация	95°C	15 – 30 сек	95°C	15 – 30 сек	25 - 35
Отжиг	50-68°C*	10 – 30 сек	--	--	
Элонгация	72°C	60 сек / 1 т.п.н.	72°C	60 сек / 1 т.п.н.	
Элонгация финальная	72°C	5 – 10 мин	72°C	5 – 10 мин	1

* температура отжига зависит от структуры праймеров

6. 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 2н

7. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

▪ 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.

▪ Mg²⁺

Стандартный 5-кратный ПЦР-буфер содержит 20 мМ MgSO₄, что соответствует 4 мМ MgSO₄ в реакционной смеси. При необходимости подбора концентрации ионов Mg²⁺ в реакционной смеси можно использовать ПЦР-буфер без солей магния и 100 мМ раствор сульфата магния. Рекомендуемая концентрация ионов Mg²⁺ в реакции ПЦР – 1 - 4 мМ.

▪ 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 праймерами не должна АО «ГенТерра». 129085. г. Москва, ул. Годовикова д. 9, стр. 1, этаж 1, подъезд 1, пом. 1.12, +7 495 721 29 70 +7 929 692 58 64 www.genterra.ru info@genterra.ru



превышать 5°C. Финальная концентрация каждого праймера в реакционной смеси может составлять 0,1 – 1 мкМ.

8. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

- **Денатурация**

Для большинства ДНК-матриц достаточно 30 сек для предварительной денатурации. Тем не менее, при необходимости (например, для геномной ДНК) время предварительной денатурации может быть увеличено до 2-3 мин. Во время термоциклирования рекомендована денатурация при 95°C в течение 10-30 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 60 сек на каждую тыс. п.н. Время элонгации может быть сокращено до 30-45 сек / 1 т.п.н для плазмид. Для «сложных» или протяженных матриц может потребоваться увеличить время элонгации до 90 с / 1 т.п.н. Рекомендована финальная элонгация при 72°C в течение 5-10 мин.

9. 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 10 ед. фермента с 0,6 мкг ДНК рBR322 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **Функциональное тестирование**

Аmplификация фрагментов разной длины (200 – 5 000 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

