



Инструкция по применению

5X Genta qPCR мастер-микс

Готовая смесь для ПЦР-РВ

Версия 1 от 12.12.2022

1. ОПИСАНИЕ

5X Genta qPCR мастер-микс – готовая к использованию смесь для проведения качественной или количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Мастер-микс обеспечивает надежную работу ПЦР в широком спектре приложений. Мастер-микс позволяет проводить ПЦР-РВ в мультиплексном формате.

5X Genta qPCR мастер-микс содержит все необходимые для проведения ПЦР компоненты, включая полимеразу Genta TaqF, дНТФ, Mg²⁺, краситель SYBR Green I и реакционный буфер. Для постановки реакции ПЦР в реакционную смесь необходимо добавить только олигонуклеотиды, матрицу и воду.

Химически инактивированная ДНК-полимераза Genta TaqF позволяет проводить подготовительные работы при комнатной температуре и обеспечивает высокоспецифичную амплификацию благодаря возможности проведения «горячего» старта. Ингибирование активности фермента снимается при его прогревании при 95°C в течение 15 минут.

2. СОСТАВ

Компоненты	RT-M-002-S	RT-M-002-L	RT-M-002-X (под заказ)
5X Genta qPCR мастер-микс	1 x 1,25 мл (250 реакций)	4 x 1,25 мл (1000 реакций)	10 мл и более

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- ПЦР-РВ
- Мультиплексная ПЦР-РВ

4. СОСТАВ ПРЕПАРАТА (1X)

60 мМ Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C); 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 4 мМ MgSO₄; 0,01% твин-20; 0,1 мг/мл БСА; 8% глицерин; 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; Genta TaqF ДНК-полимераза, SYBR Green I.

5. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Приготовление реакционной смеси можно проводить на рабочем столе. 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
5X Genta PCR мастер-микс	5 мкл	10 мкл	1-кратный (4 мМ MgSO ₄)
Прямой праймер, 10 мкМ	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
Обратный праймер, 10 мкМ	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
ДНК-матрица	X мкл	X мкл	10 пг – 200 нг
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

4. Если в амплификаторе отсутствует нагревающаяся крышка, то в каждую пробирку необходимо добавить каплю минерального масла.
5. Условия термоциклирования

Шаг	Протокол 1 (с отжигом праймеров)		Количество циклов
	Температура	Время	
Предварительная денатурация // активация Genta TaqF	95°C	15 мин	1
Денатурация	95°C	15 – 30 сек	30-40
Отжиг	50-68°C*	10 – 30 сек	
Элонгация	72°C	10-30 сек	

* температура отжига зависит от структуры праймеров

6. 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.

▪ 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. Разница температур плавления между двумя праймерами не должна



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

7. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

- **Денатурация**

Genta TaqF полимеразы, входящая в состав мастер-микса, инактивирована с помощью химической модификации, ингибирование активности фермента снимается при его прогревании при 95°C в течение 15 минут. Во время термоциклирования рекомендована денатурация при 95°C в течение 15-30 сек.

- **Отжиг**

Этап отжига обычно составляет 10–30 секунд. Температура отжига зависит от T_{пл} (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_{пл}.

- **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.

8. 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 pUC19 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 TaqF имеет чистоту $\geq 99\%$, определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

✓ **Контаминация геномной ДНК *E.coli* (ПЦР-РВ)**

Минимум 10 единиц Genta TaqF ДНК-полимеразы были проверены на наличие геномной ДНК *E.coli* с использованием SYBR Green ПЦР-РВ с праймерами, специфичными для локуса 16S рРНК *E.coli*. Контаминация не выявлена.

✓ **Функциональное тестирование**

Аmplификация фрагментов разной длины (200 – 5 000 п.н.) и разного GC состава (до 78% GC) 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

