



Инструкция по применению

Genta TaqF ДНК-полимераза

Термостабильная Taq ДНК-полимераза

Версия 1 от 12.12.2022

1. ОПИСАНИЕ

Genta TaqF ДНК-полимераза — химически модифицированный рекомбинантный аналог ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Фермент обладает 5'-3' полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью, но не имеет 3'-5' корректирующую экзонуклеазную активность. Рекомбинантный фермент Genta TaqF ДНК-полимераза подходит для использования в рутинных ПЦР, включая ПЦР в режиме реального времени.

Genta TaqF 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 до 95°C в течение 15 минут.

2. СОСТАВ

| Компоненты | RP-E-003-S | RP-E-003-L | RP-E-003-X (под заказ) |
|--|-------------|--------------|---------------------------|
| Genta TaqF 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.о.
- Низкокопийная ПЦР
- Одностадийная ОТ-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 TaqF ДНК-полимераза может быть предоставлена в буфере, не содержащем глицерин.

По желанию заказчика Genta TaqF ДНК-полимераза может быть укомплектована буфером без Mg²⁺ или 10 мМ MgSO₄ (5х ПЦР-буфер).

6. 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 |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|
| 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 TaqF 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.

5. Условия термоциклирования:

| Шаг | Протокол 1 (с отжигом праймеров) | | Протокол 2 (без отжига праймеров) | | Количество циклов |
|---|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| | Температура | Время | Температура | Время | |
| Предварительная денатурация // активация Genta TaqF | 95°C | 15 мин | 95°C | 15 мин | 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 2

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.

▪ Дезоксинуклеотидтрифосфаты

Финальная концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата 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.

8. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

- **Денатурация**

Genta TaqF полимеразы 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 5-10 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 Tпл (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 Tпл.

- **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 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

