



Инструкция по применению

5X Genta PCR мастер-микс

Готовая смесь для ПЦР

Версия 1 от 12.12.2022

1. ОПИСАНИЕ

5X Genta PCR мастер-микс – готовая к использованию смесь для проведения качественной и количественной полимеразной цепной реакции с возможностью детекции результатов в режиме реального времени. Genta PCR мастер-микс содержит все необходимые для проведения ПЦР компоненты, включая Genta TaqF ДНК-полимеразу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} и реакционный буфер. Для постановки реакции ПЦР в реакционную смесь необходимо добавить только олигонуклеотиды, матрицу и воду.

Genta TaqF ДНК-полимераза представляет собой химически модифицированную рекомбинантную ДНК-полимеразу из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Полимераза Genta TaqF не проявляет ферментативной активности в условиях приготовления реакционной смеси 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-001-S	RT-M-001-L	RT-M-001-X (под заказ)
5X Genta PCR мастер-микс	1 x 1,25 мл (250 реакций)	4 x 1,25 мл (1000 реакций)	10 мл и более

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Рутинная ПЦР ДНК-фрагментов до 5 000 п.о.
- ПЦР с детекцией в режиме реального времени с флуоресцентными зондами

4. СОСТАВ ПРЕПАРАТА (1X)

60 мМ Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C); 17 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 4 мМ $MgSO_4$; 0,01% твин-20; 0,1 мг/мл БСА; 8% глицерин; 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; Genta TaqF ДНК-полимераза.

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 mM 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
Флуоресцентный зонд, 10 мкМ (для ПЦР-РВ)	0,25 мкл	0,5 мкл	0,1 мкМ
ДНК-матрица	X мкл	X мкл	10 пг – 200 нг
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

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

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.	1
Элонгация финальная	72°C	5 – 10 мин	72°C	5 – 10 мин	

* 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



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. Разницы 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

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_{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.



Инструкция
5X Genta PCR мастер-микс

Версия 1
от 19.12.2022
Стр 4

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 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 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

