



Инструкция по применению

Genta Bst ДНК-полимераза

Bst ДНК-полимераза

Версия 1 от 17.01.2023

1. ОПИСАНИЕ

Genta Bst ДНК-полимераза — большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* (полипептид размером 67 кДа). Фермент обладает 5'-3' полимеразной активностью, но не имеет 5'-3' и 3'-5' экзонуклеазную активности. За счет сильной вытесняющей активности Genta Bst ДНК-полимераза может быть использована для проведения изотермальной амплификации, в том числе петлевой изотермальной амплификации (LAMP/ОТ-LAMP).

Оптимальная температура активности фермента — 60-65°C.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, несущего ген ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* без 5'-3' экзонуклеазного домена.

2. СОСТАВ

Компоненты	RP-E-008-S	RP-E-008-L	RP-E-008-X (под заказ)
Genta Bst ДНК-полимераза, 8 000 ед./мл	0,2 мл	5 x 0,2 мл	XXX мл
5x Genta LAMP-буфер	2 x 1,25 мл	10 x 1,25 мл	-

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот методами LAMP и ОТ-LAMP

4. БУФЕР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ (СТАНДАРТНЫЙ 1X LAMP-БУФЕР)

70 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 5 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°C); 100 мМ КCl; 0.1 мМ ЭДТА; 50% глицерин; стабилизаторы. При необходимости дальнейшей лиофилизации Genta Taq ДНК-полимераза может быть предоставлена в буфере, не содержащем глицерин.



Инструкция Genta Bst ДНК-полимераза

Версия 1
от 17.01.2023
Стр 2

По желанию заказчика Genta Bst ДНК-полимераза может быть укомплектована следующими реакционными буферами (рекомендуется, если необходимо самостоятельно подобрать концентрацию ионов Mg^{2+} в реакционной смеси):

10x LAMP-буфер 2: 200 мМ Трис- HCl (pH 8.8 при 25°C); 100 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 100 мМ KCl ; 20 мМ $MgSO_4$; 1% тритон X-100.

6. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Для минимизирования возможной ошибки пипетирования рекомендуется приготовить реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме РНК/ДНК-матрицы, в расчете на нужное количество реакций плюс одна. Внести в пробирки аликвоты реакционной смеси и затем добавить требуемое количество РНК/ДНК-матрицы.
2. Состав реакционной смеси для проведения амплификации в формате RT-LAMP (обратная транскрипция + амплификация):

Компонент	На 25 мкл реакции	Конечная концентрация
5X LAMP-буфер (25 мМ $MgSO_4$)	5 мкл	1X (5 мМ $MgSO_4$)
25 мМ смесь дНТФ (50x)	1 мкл	1 мМ каждого
100 мМ $MgSO_4$	0,25 – 0,75 мкл	До 8 мМ $MgSO_4$
FIP/BIP праймер, 10 мкМ	4 мкл	1,6 мкМ
F3/B3 праймер, 10 мкМ	0,5 мкл	0,2 мкМ
LoopF/B праймер, 10 мкМ	1 мкл	0,4 мкМ
Genta Bst ДНК-полимераза	1 – 2 мкл	0,32 – 0,64 ед./мкл
Genta Rev L обратная транскриптаза	0,33 мкл	4 ед./мкл
РНК/ДНК-матрица	X мкл	От 10 копий
Вода для ПЦР	До 25 мкл	

3. 5x LAMP-буфер представляет собой 5-кратный реакционный буфер, подходящий для амплификации методами LAMP и ОТ-LAMP. Стандартный 5-кратный LAMP-буфер содержит 25 мМ $MgSO_4$, что соответствует 5 мМ $MgSO_4$ в реакционной смеси. При проведении ОТ-LAMP не рекомендуется дополнительно добавлять сульфат магния.
4. Если требуется провести только реакцию амплификации ДНК, то обратную транскриптазу добавлять не следует. Рекомендуемая концентрация ионов Mg^{2+} для амплификации ДНК методом LAMP – 5 - 8 мМ. При необходимости подбора концентрации ионов Mg^{2+} в реакционной смеси можно дополнительно использовать 100 мМ раствор сульфата магния.
5. При необходимости выполнения рутинных экспериментов рекомендуется приготовить 25-кратную смесь праймеров для LAMP: 40 мкМ FIP, 40 мкМ BIP, 5 мкМ F3, 5 мкМ B3, 10 мкМ LoopF, 10 мкМ LoopB (в воде или ТЕ-буфере).



Инструкция
Genta Bst ДНК-полимераза

Версия 1
от 17.01.2023
Стр 3

- Для визуализации результатов в реакционную смесь можно добавить интеркалирующий краситель SYBR Green I.
- Условия термоциклирования (LAMP и RT-LAMP):

Шаг	Температура	Время	Количество циклов
Аmplификация	60-65°C	30 сек	25-50

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 16 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 16 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).

✓ **РНКазная активность**

Инкубация 48 ед. фермента с флуоресцентным РНК-субстратом при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

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

