



Инструкция по применению

5X Genta Taq-AB PCR мастер-микс

Готовая смесь для ПЦР

Версия 1 от 12.12.2022

1. ОПИСАНИЕ

5X Genta Taq-AB PCR мастер-микс – готовая к использованию смесь для проведения качественной и количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. 5X Genta Taq-AB PCR мастер-микс содержит все необходимые для проведения ПЦР компоненты, включая Genta Taq-AB ДНК-полимеразу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg²⁺ и реакционный буфер. Для постановки реакции ПЦР в реакционную смесь необходимо добавить только олигонуклеотиды, матрицу и воду.

Genta Taq-AB ДНК-полимераза представляет собой смесь ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* и специфических моноклональных антител. ДНК-полимераза Genta Taq-AB не проявляет ферментативной активности в условиях приготовления реакционной смеси и обеспечивает высокоспецифичную амплификацию благодаря возможности проведения «горячего» старта. Диссоциация комплекса и высвобождение Genta Taq-AB ДНК-полимеразы обеспечивается прогреванием выше 70°C.

2. СОСТАВ

| Компоненты | RT-M-005-S | RT-M-005-L | RT-M-005-X (под заказ) |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 5X Genta Taq-AB 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 (NH₄)₂SO₄; 4 мМ MgSO₄; 0,01% твин-20; 0,1 мг/мл БСА; 8% глицерин; 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; Genta Taq-AB 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 Taq-AB 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 Synta-F Taq | 95°C | 2-3 мин | 95°C | 2-3 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

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.

▪ 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.

7. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

● Денатурация

Предварительная денатурация ДНК и активации Genta Taq-AB проводится при 95°C в течение 2-3 мин. 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 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 рUC19 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **Чистота белка (SDS-ПААГ)**

Genta TaqAb имеет чистоту $\geq 99\%$, определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

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

Минимум 10 единиц Genta TaqAb 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.о.) 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

