

## **KTN-HS полимераза**

**Кат. # PK025S**

Версия 4 от 4 марта 2025 г.

KTN-HS — генетически модифицированная рекомбинантная Taq ДНК-полимераза с "горячим стартом".

KTN-HS полимераза лишена экзонуклеазной активности, что позволяет использовать ее в технологиях, основанных на изменении конформации зонда без его разрушения, например, Scorpion, Amplifluor, LUX и др.

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

### **Состав**

<b>Кат. #</b>	<b>Кол-во р-ций по 25 мкл</b>	<b>Состав</b>
PK025S	200	50X KTN-HS Polymerase, 100 µl 10X KTN-HS buffer (Mg free), 600 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 300 µl

**Хранение и транспортировка:** –20 °С.

**Срок годности:** 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

### **Область применения**

- Амплификация ДНК.
- ПЦР-РВ с изменением конформации зондов без его разрушения, например, технологии Scorpion, Amplifluor, LUX и др.
- HRM, плавление с использованием меченных и немеченных зондов.
- ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями.

## Ограничения к использованию

- KTN-HS полимеразу нельзя использовать для технологии TaqMan, где разгорание зонда происходит в результате 5' → 3' экзонуклеазной активности полимеразы. Для решения таких задач рекомендуется использовать HS-Taq ДНК-полимеразу (кат. ## PK017S/L/H/B, PK018, Евроген).
- Для ПЦР-PB с интеркалирующими красителями (SYBR Green I и др.) рекомендуется снизить количество KTN-HS полимеразы в реакции и использовать как 100–150X сток.

## Основные характеристики

- Быстрый "горячий старт" в первом цикле денатурации (95 °C, 5–10 с).
- Температурный оптимум активности: 70–74 °C.
- Отсутствует 5' → 3' экзонуклеазная активность и 3' → 5' экзонуклеазная активность (корректирующая).
- Длина амплифицируемых фрагментов до 5 т.п.о.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в TA-вектор.

## Протокол

► При постановке ПЦР соблюдайте зонирование помещений. Разделите зоны для приготовления реакционной смеси, внесения ДНК-матрицы, проведения ПЦР и анализа ПЦР-продукта.

1. Разморозьте при комнатной температуре все компоненты для ПЦР, кроме полимеразы. Перемешайте их содержимое на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

2. Приготовьте реакционную смесь:

- рекомендуемый объем реакции — 25 мкл;
- для избежания погрешности дозаторов и дополнительных разведений компонентов реакции рекомендуется рассчитывать реакционную смесь минимум на 4 образца;
- 10X KTN-HS buffer не содержит ионы  $Mg^{2+}$ , в состав набора входит 50 мМ раствор  $MgCl_2$ . Рекомендуемая концентрация ионов  $Mg^{2+}$  в 1X реакционной смеси — 3.5 мМ (допустимо оптимизировать концентрацию ионов в диапазоне от 2 до 5.5 мМ).

Расчетные количества ионов магния для реакционной смеси объемом 25 мкл:

Добавляемый объем 50 мМ $MgCl_2$	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.25	2.5	2.75
Конечная конц. $Mg^{2+}$	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5	5.5

– предварительно рассчитайте количество ДНК-матрицы (см. п. 5).

Компонент	Количество для реакции объемом 25 мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл (необходимо учесть объем ДНК-матрицы)
10X KTN-HS buffer (Mg free)	2.5 мкл
MgCl <sub>2</sub> (50 мМ)	1–2.75 мкл
Праймер 1 (10 мкМ)	0.5–1.25 мкл
Праймер 2 (10 мкМ)	0.5–1.25 мкл
Зонд (10 мкМ)	0.5–1.25 мкл
dNTP (10 мМ каждого)*	0.5 мкл
50X KTN-HS Polymerase	0.5 мкл

\* Рекомендуется использовать смесь dNTP (10 мМ каждого) (кат. ## PBO06S/L, Евrogen).

3. Аккуратно перемешайте реакцию смесь на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

4. Разнесите реакцию смесь в пробирки для ПЦР.

5. Внесите необходимое количество ДНК-матрицы в пробирки для ПЦР. Оптимальная концентрация матрицы в реакции зависит от источника ДНК, степени ее очистки и длины ампликона. Для амплификации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации.

Тип матрицы	Оптимальное количество
Плазмидная и фаговая ДНК	0.01–1 нг
Геномная ДНК бактерий	0.1–10 нг
Геномная ДНК эукариот	10–500 нг
Индивидуальные фрагменты линейной ДНК	0.001–0.1 нг
кДНК	до 10% объема реакционной смеси

6. При использовании амплификатора без нагревающейся крышки, наложите поверх реакционной смеси минеральное масло.

7. Установите пробирки в амплификатор. Используйте программу амплификации согласно выбранному методу анализа и способу детекции результатов:

- в ПЦР с последующим анализом результатов в агарозном геле рекомендуется включать стадии предварительной денатурации, амплификации (денатурация, отжиг праймеров, элонгация) и финальной достройки цепи. Последняя стадия используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК);
- в ПЦР-РВ рекомендуется включать стадии предварительной денатурации, амплификации (денатурация, отжиг праймеров, элонгация) и плавления;
- рекомендуется минимизировать количество циклов ПЦР, так как их избыточное количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов;
- скорость элонгации 1 т.п.о. в минуту.

### Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
PB006S	Смесь dNTP (10 мМ каждого)	200 мкл, 2 мкмоль
PB006L		2 мл (10 x 200 мкл), 20 мкмоль
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)

ЗАО Евроген  
Москва 117997  
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15  
Тел.: +7 (495) 784-7084  
order@evrogen.ru  
www.evrogen.ru