

## Gold Hot Start DNA Polymerase

### Gold Hot Start DNA Polymerase PLUS

### Gold Hot Start PCR MIX

### Gold Hot Start PCR MIX LOAD

#### Zawartość opakowania i warunki przechowywania

Gold Hot Start DNA Polymerase	SY550211	SY550212
Gold Hot Start (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Gold Hot Start	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
10x Modyfikator GC	0,1 ml	0,5 ml

Gold Hot Start DNA Polymerase PLUS	SY550211P	SY550212P
Gold Hot Start (5 U/ul)	500 U	1000 U
10x Bufor Gold Hot Start	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 x 1,2 ml	4 x 1,2 ml
10x Modyfikator GC	0,1 ml	0,5 ml
10 mM dNTP Mix	1 ml	1 ml

Polimerazy Gold są niewrażliwe na transport i okresowe przechowywanie w temperaturze pokojowej nawet do 30 dni. Długotrwałe przechowywanie produktów Gold przebiega w temperaturze -20°C.

Gold Hot Start PCR MIX	SY550231
5 x Gold Hot Start PCR MIX	250 rx 1 ml

Gold Hot Start PCR MIX LOAD	SY550241
5 x Gold Hot Start PCR MIX LOAD	250 rx 1 ml

Miksy Gold są niewrażliwe na transport i okresowe przechowywanie w temperaturze pokojowej nawet do 30 dni. Na co dzień miksy Gold można przechowywać w warunkach chłodniczych +4°C nawet do 6 miesięcy, co ułatwia codzienną pracę. Długotrwałe przechowywanie produktów Gold przebiega w temperaturze -20°C.

#### Opis komponentów

Gold Hot Start DNA Polymerase to rekombinowana termostabilna polimeraza Taq o masie cząsteczkowej 95 kDa pochodząca z *Thermus aquaticus*, syntetyzowana w *E.coli*. 1 U enzymu katalizuje przyłączenie 10 nmoli dNTP do powstającej nici DNA w kierunku od 5' do 3' w czasie 30 minut w temperaturze 74°C. Enzym posiada dodatkowo zależną od polimeryzacji aktywność egzonukleazową w kierunku od 5' do 3', brak jest natomiast aktywności egzonukleazowej w kierunku od 3' do 5', za wyjątkiem gotowego miksu Gold Hot Start PCR MIX LOAD posiadającego aktywność proofreading. Gold Hot Start DNA Polymerase dodaje do amplifikowanych fragmentów zakończenie poli-A, dzięki czemu nadają się one do bezpośredniego klonowania TA lub oczyszczania opartego o sondy oligo-dT. Enzym utrzymuje formę płynną w temperaturze -20°C dzięki buforowi do przechowywania zawierającemu 50% glicerol, Tris-HCl, KCl i EDTA.

Polimeraza Gold Hot Start jest inaktywowana poprzez unikalną modyfikację chemiczną miejsca aktywnego,

dzięki czemu wykazuje całkowitą nieaktywność w temperaturze pokojowej przed procesem standardowej aktywacji termicznej. Do inaktywacji polimerazy nie są stosowane kapsułki woskowe ani przeciwciała. Aktywacja enzymu następuje poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 15 minut przed pierwszym cyklem. Okres połowicznej utraty aktywności w temperaturze 95°C wynosi 1,5h.

Bufor reakcyjny Gold tworzy idealne środowisko pracy polimerazy. Jego unikalna kompozycja została oparta na Tris-HCl oraz (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, co optymalizuje przebieg reakcji i znacznie zwiększa specyficzność amplifikacji. Współczynnik występowania błędów wynosi poniżej 2,5 x 10<sup>-5</sup> na nukleotyd na cykl. Bufor reakcyjny Gold nie zawiera magnezu, dzięki czemu można go łatwo zastąpić np. manganem. 25 mM MgCl<sub>2</sub> dostarczany jest w osobnej probówce.

Modyfikator GC dostarczany w stężeniu 10x modyfikuje sposób topnienia DNA, co ze względu na zmianę warunków pracy polimerazy może być przydatne w przypadku występowania w matrycy dużej liczby par GC. Zastosowanie Modyfikatora GC może nie dać żadnego efektu, ale może też przynieść nieoczekiwane rezultaty; do najczęstszych należą: zwiększenie specyficzności amplifikacji (gdy wcześniej otrzymywano dodatkowe produkty), powstanie produktu lub zwiększenie wydajności reakcji (gdy wcześniej nie otrzymywano produktu, lub wydajność była niezadowalająca), zmniejszenie wydajności lub pogorszenie specyficzności reakcji uprzednio przebiegającej prawidłowo. Ze względu na nieprzewidywalność efektów użycia Modyfikatora GC nie należy stosować go, jeśli reakcja przebiega prawidłowo, a wprowadzając Modyfikator GC do metody należy początkowo nastawiać równolegle reakcje w standardowych warunkach.

Zestaw Gold Hot Start DNA Polymerase PLUS zawiera dodatkową probówkę z gotowym do użycia miksem dNTP w stężeniu 10 mM.

Gold Hot Start PCR MIX to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Gold Hot Start oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. Nowy Gold Hot Start PCR MIX posiada dodatkowo aktywność proofreading. W skład miksu poza polimerazami wchodzi bufor reakcyjny Gold, MgCl<sub>2</sub> w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy, BSA.

Gold Hot Start PCR MIX LOAD to gotowa do użycia 5-krotnie stężona mieszanina reakcyjna zawierająca polimerazę Gold Hot Start oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami i matrycą. Nowy Gold Hot Start PCR MIX LOAD posiada dodatkowo aktywność proofreading. W skład miksu poza polimerazami wchodzi bufor reakcyjny Gold, MgCl<sub>2</sub> w ostatecznym stężeniu 2,5 mM, mieszanina dNTP w ostatecznym stężeniu 200 uM każdy, BSA, obciążnik ułatwiający nakładanie próbek na żel oraz dwa barwniki migrujące w żelu – niebieski przy ok. 4 kb i żółty przy ok. 40 bp (migracja barwników uzależniona jest od stężenia agarozy). Próbkę po reakcji PCR należy nakładać bezpośrednio na żel agarozowy, bez dodatkowego buforu obciążnikowego.

**Procedura****Gold Hot Start DNA Polymerase  
Gold Hot Start DNA Polymerase PLUS**

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

1. Wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić (o ile przechowywano je w -20°C), zworteksować i zwirować.
2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA.  
Mastermiks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

<b>Składnik mastermiks</b>	<b>Ilość na 1 reakcję</b>	<b>Stężenie w reakcji</b>
Gold Hot Start (5 U/ul)	0,2 ul	1U
10x Bufor Gold Hot Start	2 ul	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2-2 ul	1,5-2,5 mM
10 mM dNTP Mix	0,4 ul	200 uM
10 uM Primer F	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
10 uM Primer R	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	<10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
<b>Objętość reakcji</b>	<b>20 ul</b>	<b>-</b>

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do próbek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej próbki i wymieszać pipetując.  
Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte próbki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela

<b>Krok cyklu</b>	<b>Temp.</b>	<b>Czas</b>	<b>Koment.</b>
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	30-60 sek.	
Annealing	50-68°C	30-60 sek.	25-35 cykli
Elongacja	72°C	1-4 min.	
Końcowa elongacja	72°C	5-10 min.	
Schłodzenie	4-10°C	∞	

7. W termocyklerze włączyć pokrywę grzejącą na temperaturę >95°C. W termocyklerach nieposiadających pokrywy grzejnej próbki należy pokryć olejem mineralnym.

**Gold Hot Start PCR MIX  
Gold Hot Start PCR MIX LOAD**

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

1. Miks należy całkowicie rozmrozić (o ile przechowywano go w -20°C), zworteksować i zwirować.

2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA. Miks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

<b>Składnik mastermiks</b>	<b>Ilość na 1 reakcję</b>	<b>Stężenie w reakcji</b>
5 x Gold Hot Start PCR MIX	4 ul	1x
10 uM Primer F	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
10 uM Primer R	0,2-0,6 ul	0,1-0,3 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	<10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
<b>Objętość reakcji</b>	<b>20 ul</b>	<b>-</b>

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do próbek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej próbki i wymieszać pipetując.  
Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte próbki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji prezentuje poniższa tabela.

<b>Krok cyklu</b>	<b>Temp.</b>	<b>Czas</b>	<b>Koment.</b>
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	10-20 sek.	
Annealing	50-68°C	30-60 sek.	25-35 cykli
Elongacja	72°C	20 s.-4 min.	
Końcowa elongacja	72°C	5-10 min.	
Schłodzenie	4-10°C	∞	

7. W termocyklerze włączyć pokrywę grzejącą na temperaturę >95°C. W termocyklerach nieposiadających pokrywy grzejnej próbki należy pokryć olejem mineralnym.

**Dalsze procedury**

Próbki po reakcji można przechowywać do 8h w temperaturze +4°C (wliczając w ten okres czas inkubacji w temp. 4-10°C w termocyklerze) lub zamrozić w -20°C w celu dłuższego przechowywania.

W celu analizy elektroforetycznej próbki po reakcji należy obciążyć poprzez wymieszanie z koncentratem buforu obciążnikowego (np. 6x Syngen Blue Loading Dye SY521051, 6x Syngen Orange Loading Dye SY521061) i nakładać na żel agarozowy. [Nie dotyczy Gold Hot Start PCR MIX LOAD]

**Producent**

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.  
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13  
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33  
kolumienki.pl, syngen.pl, [info@syngen.pl](mailto:info@syngen.pl)

