

## Instrukcja

# InfiniTaq™ PCR Kit

Zestaw PCR do amplifikacji długich fragmentów DNA (do 30 kb).

numer katalogowy	wielkość
1200-100	100 reakcji w 25 µl
1200-1000	1000 reakcji w 25 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

### Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

# Spis treści

<b>Specyfikacja</b>	<b>3</b>
<b>Zalety</b>	<b>3</b>
<b>Opis</b>	<b>3</b>
<b>Skład</b>	<b>3</b>
<b>Skład mieszaniny InfiniTaq™ PCR Mix</b>	<b>3</b>
<b>Dodatkowy sprzęt i odczynniki</b>	<b>4</b>
<b>Ważne informacje</b>	<b>4</b>
<b>Proponowany protokół reakcji PCR</b>	<b>5</b>
<b>Rozwiązywanie problemów</b>	<b>6</b>
Optymalizacja Mg <sup>2+</sup>	6
Brak produktu PCR	6
Niespecyficzne produkty PCR	6

## Specyfikacja

materiał do amplifikacji	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ludzkie genomowe DNA: do 20 kb</li> <li>• DNA faga lambda: do 30 kb</li> </ul>
aktywność korekcyjna	aktywność egzonukleazy 3'→5'
tworzone końce	tępe końce
czas wydłużania	60 s / 1 kb
zastosowanie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• konstrukcja bibliotek NGS</li> <li>• PCR, RT-PCR</li> <li>• klonowanie</li> </ul>

## Zalety

- Amplifikacja długich fragmentów DNA do 30 kb.
- 4x wyższa wierność polimerazy w porównaniu do standardowo używanych komercyjnych polimeraz.

## Opis

InfiniTag™ PCR Kit zawiera unikalną polimerazę DNA z dodatkiem antyinhibitorów, wzmacniaczy reakcji oraz mieszaninę reakcyjną z dodatkiem nukleotydów. InfiniTag™ PCR Mix tworzy optymalne środowisko dla polimerazy InfiniTag™ umożliwiające syntezę długich produktów PCR (do 30 kb).

## Skład

składnik	1200-100	1200-1000	przechowywanie
polimeraza InfiniTag™	100 µl	10 x 100 µl	-20 °C
2x InfiniTag™ PCR Mix	2 x 1 ml	20 x 1 ml	-20 °C
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1 ml	2 x 1 ml	-20 °C
woda ultraczysta	1,5 ml	10 x 1,5 ml	-20 °C

## Skład mieszaniny InfiniTag™ PCR Mix

składnik	stężenie końcowe
MgSO <sub>4</sub>	2,5 mM
dNTPs	25 mM każdego dNTPs
bufor i stabilizatory	

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- probówki PCR 0,2 ml
- termocykler PCR
- wortex
- mikrowirówka

## Ważne informacje

- Przed użyciem składniki zestawu należy całkowicie rozmrozić i starannie wymieszać przez odwracanie probówki.
- Cykliczne, siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.
- Zalecamy testowanie optymalnego stężenia w  $Mg^{2+}$  w reakcji PCR. Szczegóły w dziale [Rozwiązywanie problemów](#).

## Proponowany protokół reakcji PCR

- Całkowicie rozmrozić na lodzie i wymieszać wszystkie komponenty niezbędne do nastawienia reakcji PCR.  
Zworteksować i krótko zwirować, wstawić do lodu.

- Umieścić próbówki reakcyjne PCR na lodzie lub zimnym bloku i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji 25 µl	stężenie końcowe
2x InfiniTaq™ PCR Mix	12,5 µl	-
50 mM MgSO <sub>4</sub>	0 µl / 0,25 µl <a href="#">Optymalizacja Mg<sup>2+</sup></a>	2,5 mM / 3,0 mM
10 µM Starter 1	0,5-1 µl	0,2-0,4 µM
10 µM Starter 2	0,5-1 µl	0,2-0,4 µM
polimeraza InfiniTaq™	0,3 µl	2 U
matryca DNA	zmienna	50-1000 ng
woda ultraczysta	uzupełnić do 25 µl	-

- Mieszanię reakcyjną delikatnie wymieszać przez pipetowanie, tak aby uniknąć tworzenia się pęcherzyków powietrza, a następnie zwirować.
- Próbówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program.

etap	temperatura	czas	ilość cykli
wstępna denaturacja	95 °C	5 min	1
denaturacja	95 °C	15 s	30
przyłączenie	60-72 °C*	30 s	
wydłużanie	65 °C	30-60 s / 1 kb**	
wydłużanie końcowe	72 °C	10 min	1

\*Zalecamy ustawienie temperatury przyłączenia starterów na podstawie ich sekwencji zgodnie z powszechnie przyjętą praktyką obliczania temperatury przyłączenia starterów.

\*\*Zalecamy ustawić czas wydłużenia na 60 s/1 kb dla fragmentów dłuższych niż 5 kb.

- Produkt PCR przechowywać w temperaturze od -20 °C do +4 °C.

## Rozwiązywanie problemów

### Optymalizacja Mg<sup>2+</sup>

Podstawowa mieszanina **2x InfiniTag™ PCR Mix** zawiera jony Mg<sup>2+</sup> o stężeniu odpowiednim dla otrzymania większości amplikonów. W przypadku problemów z uzyskaniem spodziewanego produktu zaleca się optymalizację stężenia Mg<sup>2+</sup>. Najlepszą praktyką jest przeprowadzenie prób odpowiednio dla stężeń:

- **2,5 mM** - reakcja przeprowadzona przy użyciu podstawowej mieszaniny **2x InfiniTag™ PCR Mix / 25 µl** mieszaniny reakcyjnej.
- **3 mM** - reakcja przeprowadzona przy użyciu podstawowej mieszaniny **2x InfiniTag™ PCR Mix** z dodatkiem **0,25 µl 50 mM MgSO<sub>4</sub> / 25 µl** mieszaniny reakcyjnej.

### Brak produktu PCR

W przypadku braku produktu PCR należy:

- Obniżyć temperaturę przyłączenia o 5 °C.
- Stopniowo zwiększać ilość matrycy DNA o 100 ng, maksymalnie do 1000 ng.
- Sprawdzić jakość matrycy DNA na żelu agarozowym.

### Niespecyficzne produkty PCR

Jeżeli produkty PCR są niespecyficzne należy zoptymalizować warunki reakcji wybierając jedną z poniższych opcji:

- Podniesienie temperatury przyłączenia starterów o 5 °C.
- Zmniejszenie stężenia starterów o połowę.
- Zmniejszenie ilość cykli o 5.
- Stopniowe zmniejszanie ilość matrycy DNA o 100 ng aż do 100 ng.





**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk  
tel. 883 323 761, 600 776 268  
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2024-1

