

2X Hot Start PCR Master Mix
Código: 13-10502-01

Instruções de Uso

1. Descrição

2X Hot Start PCR Master Mix é uma solução otimizada pronta para uso contendo Taq DNA Polimerase, anticorpo anti-Taq DNA polimerase, tampão de reação de PCR, MgCl₂, dNTPs e estabilizadores. É ideal para aplicações de PCR de rotina a partir de modelos, incluindo soluções de DNA puro, colônias bacterianas e produtos de cDNA. Pode amplificar fragmentos de DNA até 5 kb.

O anticorpo anti-Taq DNA polimerase inibe a atividade da polimerase, proporcionando um “hot start” automático e permite a configuração conveniente de reações de PCR à temperatura ambiente. Devido à ligação específica do anticorpo, o 2X Hot Start PCR Master Mix está presente em uma forma inativa e é reativado após uma etapa de desnaturação em ciclos de PCR a 95°C.

O início da reação em temperatura elevada, mediada por anticorpos também pode melhorar a especificidade da PCR e o rendimento de fragmentos de DNA amplificados.

2. Aplicações

PCR

Primer extension

Análise de *Microarrays*

PCR de alto rendimento

3. Lista de componentes

Cada produto contém reagentes suficientes para realizar reações de PCR de 50 µL.

Tampa	13-10502-01	100 reações
2 x 1.25 mL	2X Hot Start PCR Master Mix	Tampa Transparente

4. Protocolo

Este protocolo é para um tamanho de reação de 50 µL. O tamanho da reação pode ser ajustado conforme desejado.

Para reação múltipla, prepare uma mistura principal dos componentes comuns a todas as reações para reduzir os erros de pipetagem.

a. Descongele o PCR Master Mix à temperatura ambiente.

Quando descongelado, ressuspender o

Master Mix por *vortex* e, em seguida, centrifugar brevemente para coletar a solução no fundo do tubo.

b. Prepare a seguinte mistura de reação para cada amostra.

Componentes	Volume	Final Conc.
2X Hot Start PCR Master Mix	25 μ L	1X
10 μ M Forward Primer	1 μ L	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
10 μ M Reverse Primer	1 μ L	0.2 μ M (0.05–1 μ M)
DNA template	variável	< 1 μ g
Água nuclease free	to 50 μ L	

Parâmetros de amplificação recomendados para PCR

Início	Etapa	Temp	Tempo
Ativação Teq DNA polymerase	Desnaturação inicial	95°C	2 min
Ciclos (25 to 45 cycles)	Desnaturação	95°C	30sec
	Anelamento	55°C (Primer T _m)	30sec
	Extensão	72°C	60sec Per kb

Step	Extensão final	72°C	5 min
------	----------------	------	-------

Diretrizes Gerais

Modelo de DNA

O uso de modelos de DNA purificados de alta qualidade aumenta muito o sucesso da amplificação. As quantidades recomendadas de DNA template para uma reação de 50 µl são as seguintes: DNA genômico 1 de – 1 µg

Plasmídeo ou DNA viral 1 pg - 1 ng

Primers

Os iniciadores geralmente têm 20 entre 40 nucleotídeos de comprimento e idealmente têm um conteúdo de GC de 40 a 60%. Programas de computador como Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) podem ser usados para projetar ou analisar primers. A concentração final de cada primer em uma reação pode ser 0,05–1µM, tipicamente 0,1– 0,5µM.

Mg++ e aditivos

A concentração de Mg++ de 1,5–2,0 mM é ideal para a maioria dos produtos de PCR gerados com Taq DNA Polimerase. A concentração final de Mg++ em 1X Hot Start PCR Master Mix é de 1,5 mM. Isso suporta amplificação satisfatória da maioria dos *amplicons*. No entanto, o Mg++ pode ser otimizado em incrementos de 0,5 ou 1,0 mM usando MgCl₂.

A amplificação de alguns alvos difíceis, como sequências ricas em GC, pode ser melhorada com aditivos, como DMSO, betaína ou Formamida. Veja informações adicionais sobre Aditivos de PCR no link a seguir: <http://www.staff.uni-mainz.de/lieb/additiva.html>

Desnaturação

Uma desnaturação inicial de 30 segundos a 95°C é suficiente para a maioria dos moldes de DNA puro. Para template modelos difíceis, como sequências ricas em GC, uma desnaturação mais longa de 2 a 5 minutos a 95°C é recomendada antes do ciclo de PCR para desnaturar completamente o template. Com a PCR de colônia, recomenda-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C.

Uma etapa de desnaturação de 15 a 30 segundos a 95°C é recomendada durante os ciclos de PCR.

Anelamento

A etapa de Anelamento é tipicamente de 15 a 60 segundos. A temperatura de Anelamento é baseada na T_m do par de *primers* e normalmente é de 45 a 68°C. As temperaturas de Anelamento podem ser otimizadas fazendo uma PCR de gradiente de temperatura começando 5°C abaixo da T_m calculada.

Extensão

A reação de extensão é tipicamente realizada na temperatura ideal para a Taq DNA polimerase: 72°C. Permitir 1 minuto para cada 1kb de DNA a ser amplificado. Recomenda-se uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Número do ciclo

Geralmente, 25 a 35 ciclos produzem produto suficiente. Podem ser necessários até 45 ciclos para detectar alvos com baixo número de cópias.

Produto PCR:

Os produtos de PCR gerados usando Taq DNA Polimerase contêm saliências da na extremidade 3'; portanto, os produtos de PCR podem ser ligados a vetores dT/dU-*overhang*.

5. Ensaio de Controle de Qualidade

Ensaio Funcional

2X Hot Start PCR Master Mix é testado para desempenho na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar uma região de 2 kb do gene beta-globina de 50 ng de DNA genômico humano. O produto de PCR resultante é visualizado em um gel de agarose corado com brometo de etídio. Parâmetros de amplificação para PCR do gene da beta-globina:

Início	Etapa	Temp	Tempo
Hold	Initial denaturation	95°C	2 min
30 cycles	Desnature	95°C	30sec
	Anneal	55°C	15sec
	Extend	72°C	60sec
Hold	Final extension	72°C	5 min

Primers usados para amplificação do gene da beta-globina humana:

2kb_Forward (5' - TCT TGG CAG AGT GTA TGT GTC - 3')

2kb_reverso (5' - TAA CCG ATG AGA TCA ACT GGA A - 3')

Ensaio de Nuclease: Nenhuma atividade de endonuclease ou exonuclease contaminante detectada.

6. Armazenamento

Armazenar em -20°C .

7. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **2X Hot Start PCR Master Mix** por ela revendidos contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

8. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA- CRBM 20.951/1

9. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br