

2X Hot Start PCR Master Mix

13-10502-01 - 100 reações

Armazenamento: –20°C

A 2X Hot Start PCR Master Mix é estável por dois meses em 4°C. Para uso frequente, uma alíquota pode ser mantida em 4°C.

Descrição

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

O anticorpo anti-*Taq* DNA polimerase inibe a atividade da polimerase, proporcionando um “início a quente” automático e permite a configuração conveniente de reações de PCR à temperatura ambiente. Devido à ligação específica do anticorpo, a 2X Hot Start PCR Master Mix está presente numa forma inativa e é reativado após uma etapa de desnaturação no ciclo de PCR em 95°C.

O *hot-start* mediado por anticorpos também pode melhorar a especificidade da PCR e o rendimento de fragmentos de DNA amplificados.

Aplicações

- PCR convencional e variações
- *Primer Extension Assay*
- *High-Throughput PCR*

Componentes

Cada produto contém reagentes suficientes para realizar 100 reações de PCR de 25 µL de volume final cada.

Código N°	13-10502-01	100 reações
1 x 1.25 mL	2X Hot Start PCR Master Mix	TAMPA TRANSPARENTE

Protocolo

Rev_03_Out_24

Este protocolo é para um volume final de reação de 25 µL. O tamanho da reação pode ser ajustado conforme desejado.

Para reações múltiplas, preparar uma mistura mãe dos componentes comuns a todas as reações para reduzir erros de pipetagem.

1. Descongelar a *PCR Master Mix* à temperatura ambiente. Quando descongelada, ressuspender a *Master Mix* agitando em vórtex e depois centrifugar brevemente para recolher a solução no fundo do tubo.

2. Preparar a seguinte mistura de reação para cada amostra:

Componente	Volume	Concentração Final
2X Hot Start PCR Master Mix	12,5 µL	1X
10 µM Forward Primer	1 µL	0.2 µM (0.05–1 µM)
10 µM Reverse Primer	1 µL	0.2 µM (0.05–1 µM)
DNA template	variable	< 1 µg
Nuclease-free water	to 25,0 µL	

Parâmetros de amplificação recomendados para PCR:

Etapas	Passo	Temp	Tempo
Hold	<i>Initial denaturation</i>	95°C	2 min
	<i>Denature</i>	95°C	30 sec
Cycles (25 to 45 cycles)	<i>Anneal</i>	55°C (Primer T _m)	30 sec
	<i>Extend</i>	72°C	60 sec per kb
Hold	<i>Final extension</i>	72°C	5 min

Guia Geral

DNA template:

O uso de *templates* de DNA purificados de alta qualidade aumenta muito o sucesso da amplificação. As quantidades recomendadas de *template* de DNA para uma reação de 50 µL são as seguintes:

DNA genômico	1 ng–1 µg
Plasmídeo ou DNA viral	1 pg – 1 ng

Primers:

Os iniciadores oligonucleotídeos têm geralmente entre 20 a 40 nucleotídeos e, idealmente, um conteúdo de GC de 40 a 60%. Programas de computador como o Primer3 (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 de 0,05–1 µM, normalmente 0,1–0,5 µM.

Mg⁺⁺ e aditivos:

A concentração de Mg⁺⁺ entre 1,5 e 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. Isto suporta uma amplificação satisfatória da maioria dos *amplicons*. No entanto, o Mg⁺⁺ pode ser otimizado ainda mais 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 PCR no seguinte link: <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 *amplicons* de *templates* de DNA puro. Para *templates* difíceis, como sequências ricas em GC, recomenda-se uma desnaturação mais longa de 2–5 minutos a 95°C antes do ciclo de PCR para desnaturar completamente o *template*. Com a PCR de colônias, recomenda-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C. Recomenda-se um passo de desnaturação de 15–30 segundos a 95°C durante os ciclos de PCR.

Anelamento:

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

Extensão:

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

Número de ciclos:

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

Produtos de PCR:

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

Ensaio de Controle de Qualidade**Ensaio Funcional:**

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

Parâmetros de amplificação para PCR do gene da beta-globina:

Etapa	Passo	Temperatura	Tempo
<i>Hold</i>	Desnaturaçãoi nicial	95°C	2 min
30 cycles	Desnaturaçãoi	95°C	30 sec
	Anelamento	55°C	15 sec
	Extensão	72°C	60 sec
<i>Hold</i>	Extensão Final	72°C	5 min

Primers usados para a amplificação do gene de beta globina humana:

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

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

Ensaio de Nuclease:

Nenhuma atividade contaminante de endonuclease ou exonuclease foi detectada.