



Ficha técnica PCR Mix (2x)

Catálogo:

MT0050
50 RXNS

MT0200
200 RXNS

MT1000
1000 RXNS

ALMACENAR A -20 °C

PCR Mix (2x) es una mezcla optimizada de **Taq DNA polimerasa**, desoxirribonucleótidos (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP y dTTP), amortiguador (buffer) de reacción y $MgCl_2$.

Descripción de los componentes:

50 U/mL Taq DNA polimerasa de origen recombinante; la enzima cataliza la síntesis de DNA en dirección 5' → 3' con nula actividad exonucleasa (3' → 5'), capaz de amplificar hasta 5kb, en el resto de la mezcla están: el amortiguador (buffer) 2x ajustado a pH 8.5 para el óptimo desempeño de la enzima, desoxirribonucleótidos a 0.4 mM cada uno, $MgCl_2$ a 3 mM.

Por sus características es adecuado en aplicaciones como:

- PCR punto final
- Producción de productos de PCR para clonado por TA
- PCR de rutina con alta reproducibilidad

Reactivos añadidos por el usuario:

Agua libre de nucleasas, cebadores (primers/oligonucleótidos) y DNA de origen genómico, plasmídico o viral.

Definición de unidad:

Una unidad de enzima es definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la unión de 10 nanomoles de dNTP al ácido nucleico sintetizado en 30 min a 74 °C. Las condiciones de la reacción son definidas en el ensayo estándar.

Protocolo

Recomendaciones generales:

Se recomienda poner el reactivo en hielo y no acelerar el descongelamiento, mezclar mediante vórtex para homogenizar la mezcla una vez descongelado. Si va a preparar más de una reacción es conveniente hacer una mezcla previa de los ingredientes para minimizar el error al momento de añadir los componentes de reacción. Se recomienda preparar una mezcla del número de reacciones deseadas más una reacción extra.

Componentes de reacción

| VOLUMEN DE REACCIÓN | 50 µL | 25 µL |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| PCR Mix (2x) | 25 µL | 12.5 µL |
| Cebador 1 (PRIMER FORWARD, 10 µM) | 1 µL (0.2 µM) | 0.5 µL (0.2 µM) |
| Cebador 2 (PRIMER REVERSE, 10 µM) | 1 µL (0.2 µM) | 0.5 µL (0.2 µM) |
| Templado DNA | 10 pg - 1 µg | 10 pg - 1 µg |
| Agua libre de nucleasas | Llevar a: 50 µL | Llevar a: 25 µL |

Termociclador

Si emplea un termociclador sin cubierta térmica, se recomienda poner aceite mineral para evitar la evaporación; también es recomendable homogenizar la mezcla antes de ponerla en el termociclador.

Condiciones de reacción:

En la siguiente tabla se muestran condiciones estándar para un proceso de amplificación.

| PASO | TEMP °C | TIEMPO | CICLOS |
|---------------------------|---------|------------|---------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 2 - 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 30 - 60 s | 25 - 40 |
| Alineación | 50 - 68 | 30 - 60 s | |
| Extensión | 72 | 60 s/kb | |
| Extensión final | 72 | 5 - 10 min | 1 |

Acerca de los componentes de la reacción

| CEBADORES (PRIMERS / OLIGONUCLEÓTIDOS) | CONCENTRACIÓN |
|--|---------------|
| Forward / Reverse | 0.1 - 1.0 µM |
| DNA | CONCENTRACIÓN |
| Templado | 10 pg - 1 µg |

Cebadores (PRIMERS / OLIGONUCLEÓTIDOS)

Para una reacción de amplificación adecuada es necesario realizar un diseño óptimo de los cebadores. Por lo general la longitud de estos es de entre 20-40 nucleótidos y con contenidos de GC no mayores al 60 % cuya distribución sea uniforme, de otro modo habría que hacer una optimización de la mezcla de reacción añadiendo otros reactivos como DMSO, etc. Es importante considerar la temperatura de alineación para lo cual es necesario calcular la T_m de los cebadores y buscar que no haya una diferencia superior a los 5 °C entre ellos para un alineamiento óptimo en la temperatura seleccionada. Si los cebadores son superiores a los 25 nucleótidos se recomienda el uso de servidores para analizar si existe la formación de estructura secundaria que podría interferir con la alineación a la región blanco. Se recomienda que la concentración de cebadores en la reacción sea de: 0.1 - 1 µM.

Desnaturalización de DNA

Se recomienda 2 min a 95 °C si el DNA no posee un contenido alto de GC, de ser así; se recomienda ampliar este tiempo hasta 5 min. En caso de realizar PCR de colonia se recomiendan 5 min.

5'BIO

Durante la reacción de amplificación se sugiere que la desnaturalización sea de 15-30 seg. Aunque nuevamente si el material genético tiene un alto contenido de GC se puede extender por 30 seg. hasta encontrar el tiempo óptimo.

Alineamiento

Típicamente el alineamiento debería ser 5 °C por debajo de la Tm de los cebadores con un tiempo de entre 30-60 seg. Si la Tm es superior a 60°C es necesario optimizar la reacción haciendo adecuaciones por medio de la adición de aditivos como DMSO u otro.

Extensión

Se sugiere una temperatura de extensión de 72 °C sin embargo, es posible situarla entre 70-75 °C. Si el fragmento a amplificar es mayor a 1 kb, se sugiere adicionar 60 segundos por kb extra.

La extensión final puede ser de 5-7 minutos. Si se busca que el producto de PCR sea clonado en un vector TA se sugiere prolongar la extensión final por 30 minutos para asegurar la adición de la cola de adeninas.

Análisis de calidad

Pureza de la enzima:

Taq DNA polimerasa fue determinada con > 95 % de pureza por medio de SDS-PAGE con azul de Coomassie como colorante.

Ensayo de actividad:

Taq DNA polimerasa ha sido probada en su funcionamiento mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) amplificando una región de 300 pb de DNA genómico de *Acinetobacter* sp. El producto de PCR ha sido visualizado como una banda única en gel de agarosa de 1 % usando SYBR safe como colorante.

Actividad endonucleasa – exonucleasa:

NO DETECTADO.

RECOMENDADO SOLO PARA
USO EN INVESTIGACIÓN, NO
PARA DIAGNÓSTICO.

Presentaciones

Todas las reacciones son de 50 µL

| CONTENIDO | MT0050 | MT00200 | MT1000 |
|-------------------------|-------------|-------------|--------------|
| # de reacciones | 50 | 200 | 1000 |
| PCR Mix (2x) | 1 x 1.25 mL | 4 x 1.25 mL | 20 x 1.25 mL |
| Agua libre de Nucleasas | 1 x 1.25 mL | 4 x 1.25 mL | 20 x 1.25 mL |

Sabemos la importancia de contar con reactivos de calidad, costo y tiempo de entrega adecuados; por ello ponemos nuestro compromiso, capacidad y habilidades para la elaboración de nuestros productos.
¡Gracias por tu preferencia!



Tu opinión es muy importante:
5primabio@gmail.com / 55 3415 0949

5PRIMABIO SAS DE CV.

