

ECRA HIFI

Kit enzimático para PCR de alta fidelidade

Quantidade 100 U; Código do produto: EB1-17



Validade de 12 meses após a abertura.

Temperatura de transporte: -20 °C a 10 °C.

Temperatura de armazenamento: -20 °C.

Descrição do produto

A **ECRA HIFI** é uma DNA polimerase de *Pyrococcus* sp., com atividade otimizada e alta fidelidade, oferecendo alta performance para qualquer tipo de PCR e outras aplicações. A **ECRA HIFI** é capaz de gerar grandes transcritos em velocidades superiores às *Taq*s/DNA polimerases tradicionais mesmo com o uso de moldes de difícil amplificação. A enzima possui atividade de DNA polimerase 5'→3' e atividade de exonuclease gerando *blunt ends*/extremidades cegas na posição 3'→5'.

Diretrizes para o uso da ECRA HIFI

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (µL)	Cor
ECRA HIFI	50	Azul
Tampão HF 5X	1800	Vermelho
H₂O	1800	Branco
MgCl₂ 50 mM	1800	Verde
DMSO	1800	Amarelo

Condições de reação básicas para PCR

Descongele todos os componentes necessários para a reação, com exceção da enzima, que deve ser mantida em gelo e de preferência ser retirada do estoque apenas no momento de sua utilização. É possível que ocorra a formação de precipitado nos tubos de tampão. Cuidadosamente misture e centrifugue os tubos antes de abri-los. As reações de PCR devem ser preparadas preferencialmente em gelo. A **ECRA HIFI** é viscosa e, portanto, deve ser pipetada cuidadosamente. De preferência, adicione a enzima por último na montagem das reações. Para garantir a atividade da enzima utilize o tampão fornecido ou outro tampão para enzimas de alta fidelidade (veja as notas sobre os componentes reacionais a seguir).

Tabela 2. Protocolo para montagem da reação

Componente	Volume 50 µl	Volume 20 µl	Conc. final
Tampão HF 5X	10 µl	4 µl	1X
dNTP 10 mM	1 µl	0,4 µl	200 µM
Primer F	x µl	x µl	0,5 µM
Primer R	x µl	x µl	0,5 µM
DNA molde	y µl	y µl	
DMSO**	1,5 µl	0,6 µl	3%
ECRA HIFI	0,5 µl	0,2 µl	0,02 U/µl
H₂O	para 50 µl	para 20 µl	

* A concentração final de 0,5 µM de primers pode variar entre 0,2 e 1,0 µM, se necessário;

** A adição de DMSO é opcional.

Notas sobre componentes reacionais

Enzima

A **ECRA HIFI** DNA polimerase é fornecida a 2 U/µL. A quantidade ótima de enzima depende da quantidade da fita molde e o comprimento do produto de PCR. Normalmente, uma unidade (1U) de DNA polimerase por 50 µL de volume de reação apresenta bons resultados, mas as quantidades ótimas podem variar de 0,5 a 2 U por reação dependendo do comprimento do fragmento amplificado e dificuldade de amplificação da amostra em particular. Não exceda 2 U/50 µL (0,04 U/µL), especialmente para produtos de amplificação menores que 5 kb.

Tampões

A **ECRA Biotec** fornece junto com a **ECRA HIFI** um tampão testado para suas aplicações mais comuns, contendo magnésio em concentração de 7,5 mM, necessário para uma boa amplificação. O tampão HF assegura a alta fidelidade.

Aditivos de PCR

A concentração de Mg²⁺ é crítica, uma vez que a **ECRA HIFI** é uma enzima dependente de magnésio. Por outro lado, seu excesso estabiliza a dupla fita de DNA e impede sua desnaturação completa, podendo também

diminuir a especificidade da reação. Em geral, a concentração ótima de Mg^{2+} é de 0,5 a 2 mM sobre a concentração total de dNTP para PCRs convencionais. Geralmente tampões para DNA polimerase de alta fidelidade já possuem magnésio, mas ele pode ser suplementado para otimização da reação.

A adição de DMSO ajuda na desnaturação de fitas de DNA com alta proporção de GC, sendo recomendada para estes casos. Ela deve ser evitada para moldes com GC% muito baixo ou ampliações maiores que 20 kb.

Molde de DNA

Recomendamos o uso de 40 a 80 ng/50 μ L reação de DNA de baixa complexidade (como plasmídeos, DNA lambda ou BAC) e 100 a 250 ng/50 μ L reação de DNA genômico de alta complexidade.

Condições dos ciclos

As condições ótimas podem diferir do protocolo padrão.

Tabela 3. Programação do termociclador

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	98 °C	30 s	
Desnaturação	98 °C	5 a 10 s	25 a 35 ciclos
Anelamento dos primers	X °C	10 a 30 s	
Extensão	72 °C	30 s/kb	
Extensão final	72 °C	5 a 10 min	
Término	4 °C		

Alinhamento dos primers

Para que os primers utilizados se alinhem corretamente no DNA molde, uma temperatura condizente com as características dos mesmos deve ser utilizada. Uma temperatura muito alta resultará em pouca ou nenhuma amplificação e uma temperatura muito baixa em inespecificidade no anelamento.

Extensão

O tempo de extensão depende principalmente do comprimento do fragmento a ser amplificado. A enzima **ECRA HIFI** é capaz de amplificar 1 kb em 30 s.

Resolução de problemas

Nenhum produto de PCR ou baixo rendimento

- Use mais DNA molde e certifique-se de que não esteja degradado;
- Aumente o número de ciclos, prolongue o tempo de extensão e otimize a temperatura de anelamento dos primers;
- Use dNTP de alta qualidade e não use misturas de dNTP que contenham dUTP;
- Adicione DMSO e $MgCl_2$ na reação;
- Verifique o estado dos primers e se os mesmos não formam dímeros ou *hairpins*;
- Otimize a concentração de enzima e tente utilizar um tampão HF ou GC alternativo.

Produtos não específicos

- Use menos DNA molde e certifique-se de que não está contaminado;
- Aumente a temperatura de anelamento dos primers, encurte o tempo de extensão e reduza o número de ciclos;
- Verifique o desenho dos primers e se os mesmos não anelam em outros locais do molde;
- Reduza a concentração de enzima e de primers e otimize a concentração de Mg^{2+} .

Especificações

Tampão de armazenamento: Tris-HCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; NP-40 0,1% (v/v); Tween20 0,1% (v/v); DTT 1 mM; glicerol 50% (v/v); pH 8,0.

H₂O: a água fornecida pela *ECRA biotec* é tratada para eliminação de nucleases.

Definição de unidade: Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que irá incorporar, a 72 °C, 10 nmol de dNTP em 30 min sob as condições de ensaio estabelecidas. O ensaio foi realizado através de comparação com DNA polimerases de atividade já mensurada.

Referências

Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M., Vander. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced

processivity and improved performance in vitro. Nucleic Acids Res. 32: 1197-1207. Breslauer et al., (1986) PNAS 83, 3746-3750.

Garantia

A *ECRA Biotec* garante que seus produtos atendem às especificações indicadas na seção de dados técnicos. Substituiremos os produtos gratuitamente se não estiverem conforme as especificações. Esta substituição deve ser feita dentro do prazo de 60 dias após o recebimento. Em consideração aos compromissos acima referidos pela *ECRA Biotec*, o comprador concorda e aceita as seguintes condições:

- Que esta garantia substitui todas as outras garantias, expressas ou implícitas;

- Que único recurso do comprador será para obter a substituição do produto de forma gratuita.

Uso para a pesquisa

Estes produtos se destinam a fins de pesquisa por pessoas qualificadas.

Aviso aos usuários

É de responsabilidade do usuário utilizar os produtos da *ECRA Biotec* para determinar por si próprio a adequação de qualquer material e/ou procedimento para uma finalidade específica e que adote as precauções de segurança que possam ser necessárias.

ECRA HIFI é uma marca comercial da *ECRA Biotec*.

Versão 1 (Fev/2021)

ECRA Biotec Serviços e Pesquisas LTDA.

Estr. Giuseppina Vianelli Di Napolli, 1455, Conj W8, Campinas - SP 13086-530
sac@ecrabiotec.com