

ECRA LF-BST

DNA polimerase de deslocamento de fita resistente ao calor

Quantidade 1.600 U; Código do produto: EB6-20



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 LF-BST é uma DNA polimerase resistente ao calor com propriedades de deslocamento de fita, que sintetiza uma nova fita de DNA enquanto dissocia a ligação de hidrogênio do DNA molde. Esta característica permite a replicação do DNA a uma temperatura constante (55 a 65 °C), pois a síntese não é inibida pela estrutura secundária do DNA. A ECRA LF-BST, corresponde a fração inteira da polimerase de *Bacillus stearothermophilus* que contém a atividade 5' → 3', mas não possui atividade 5' → 3' de exonuclease. A ECRA LF-BST é ideal para a amplificação isotérmica (LAMP), e para o rápido sequenciamento de nano quantidades de DNA com regiões de alto GC.

Diretrizes para o uso da ECRA LF-BST

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (µL)	Cor
ECRA LF-BST	200	Azul
Tampão isotérmico 10X	1000	Vermelho
MgCl ₂ 50 mM	1000	Verde

Condições de reação básicas para PCR

O mix de primers para LAMP pode ser preparado com todos os 4 ou 6 (com Loop) primers. Uma mistura de primers 10X deve conter: 16 µM FIP, 16 µM BIP, 2 µM F3, 2 µM B3, 4 µM Loop F, 4 µM Loop B em TE ou água. A execução de um controle sem RNA/DNA molde é recomendada para garantir a especificidade da amplificação. Se necessária otimização, tente variar Mg²⁺ (4 a 10 mM final) ou de ECRA LF-BST/ECRA RTX, ou alterar a temperatura de reação (50 a 68 °C). Cuidadosamente misture e centrifugue os tubos antes de abri-los. As reações de PCR devem ser preparadas em gelo. A ECRA LF-BST é viscosa e, portanto, deve ser pipetada

cuidadosamente. De preferência, adicione a enzima por último na montagem das reações.

Tabela 2. Protocolo para montagem da reação

Componente	Volume 25 µL	Conc. Final
Tampão isotérmico 10X	2,5 µL	1X (2 mM MgSO ₄)
MgCl ₂ 50 mM	3 µL	6 mM (8 mM total)
dNTP Mix (10 mM)	3,5 µL	1,4 mM
Mix Primers 10X	2,5 µL	4,4 µM
ECRA LF-BST	1 µL	320 U/mL
ECRA RTX	0,5 µL	4000 U/mL
DNA molde	X µL	> 100 cópias
H ₂ O	para 25 µL	

1. Misture os reagentes acima;
2. Incubar a reação por 30 a 60 min a uma temperatura entre 60 e 68 °C;
3. Se necessário, inative a reação aquecendo-a a 80 °C por 10 min.

Resolução de problemas

A amplificação isotérmica é uma técnica extremamente sensível e cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação das áreas de instalação e equipamentos com DNA de reações anteriores. Um problema comum é a amplificação em controles negativos sem DNA molde por contaminação cruzada ou por amplificação de primers inespecíficos que formam dímeros. Geralmente é necessário estudar de 2 a 4 pares de primers para se escolher um par ideal. Aditivos de PCR como DMSO e betaína podem ser avaliados para melhorar as reações.

Especificações

Definição unitária

Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que irá incorporar 10 nmol de dNTP em material insolúvel em ácido em 30 min a 65 °C de acordo com calibração com enzimas previamente padronizadas.

Tampão de armazenamento: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,1 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; NP-40 0,01% (v/v); Glicerol 50% (v/v); pH 7,5.

Tampão isotérmico 10x: Tris-HCl 200 mM; KCl 1 M; (NH₄)₂SO₄ 100 mM; MgSO₄ 60 mM; estabilizadores e detergentes; pH 8.8.

Armazenamento e uso

Armazene todos os componentes a -20 °C. Descongele o buffer de reação à temperatura ambiente e armazene imediatamente após o uso.

Controle de qualidade

Este produto passou pelos seguintes ensaios de controle de qualidade: análise de gel SDS-PAGE para pureza; ausência e atividades de ribonuclease; atividade em DNA genômico.

Referências

Evolution of a Thermophilic Strand-Displacing Polymerase Using High-Temperature Isothermal Compartmentalized Self-Replication John N. Milligan, Raghav Shroff, Daniel J. Garry, and Andrew D. Ellington. *Biochemistry* 2018 57 (31), 4607-4619.

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 LF-BST 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