

ECRA RTX

Xenopolimerase para amplificação isotérmica – LAMP

Quantidade 40.000 U; Código do produto: EB9-20



Validade de 12 meses após a abertura.

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

Temperatura de armazenamento: -20 °C.

Descrição do produto

A enzima **ECRA RTX** é uma DNA polimerase engenheirada para a síntese de cDNA utilizando RNA como molde. Esta enzima pode sintetizar uma fita de DNA complementar iniciando a partir de um primer usando RNA (síntese de cDNA) ou DNA de fita simples como molde. A **ECRA RTX** é uma enzima robusta para detecção de RNA ou DNA em reações de amplificação e é particularmente adequada para uso em (RT) LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop). A propriedade da **ECRA RTX** permite aplicações de alto rendimento e aumenta a consistência e especificidade das reações de amplificação. A **ECRA RTX** contém atividade RNase H intacta. Esta abordagem alternativa ao PCR não requer variação da temperatura da reação o que gera reações extremamente rápidas e sem o uso de termocicladores. A **ECRA RTX** foi projetada para fornecer uma etapa simples e rápida para amplificação por LAMP de alvos de DNA ou RNA. A enzima pode ser adicionada de uma Bst polimerase para as reações de RT-LAMP.

Diretrizes para o uso da ECRA RTX

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (µL)	Cor
ECRA RTX	100	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 RTX/BST** DNA polimerase, 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 RTX** polimerase 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 seguintes reagentes:
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 RNA/DNA de reações anteriores. Um problema comum é a amplificação em controles negativos sem RNA/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 isotérmico 10X: Tris-HCl 200 mM; KCl 500 mM; (NH₄)₂SO₄ 100 mM; MgSO₄ 20 mM; estabilizantes e detergentes; pH 8,8.

Tampão de armazenamento: Tris-HCl 10 mM; KCl 100 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,1%; Glicerol 50% (v/v); pH 7,5.

Armazenamento e uso

Armazene todos os componentes a -20 °C. Descongele o tampão isotérmico 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 DNase; atividade em RNA e DNA total.

Referências

Maranhão, André C; Ellington, Andrew D; Bhadra, Sanchita (2020). A one-enzyme RT-qPCR assay for SARS-CoV-2, and procedures for reagent production.

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 RTX 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