

ECRA TAQ

Kit enzimático para PCR

Quantidade 250 U; Código do produto: EB5-20



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 TAQ** é uma DNA polimerase comumente utilizada em reações de PCR de rotina. É otimizada para garantir alta especificidades e mínima formação de produtos inespecíficos, além de ser tratada para remoção de DNA residual. A enzima **ECRA TAQ** catalisa a polimerização de nucleotídeos em dupla fita de DNA na direção 5'→3' na presença de magnésio. Também possui atividade exonuclease no sentido 5'→3' dependente de polimerização, mas a atividade exonuclease 3'→5' é ausente.

Diretrizes para o uso da ECRA TAQ

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (µL)	Cor
ECRA TAQ	50	Azul
Tampão TAQ	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 TAQ** 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 50 µl	Volume 20 µl	Conc. final
Tampão TAQ 10X	5 µL	2 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 TAQ	0,5 µL	0,2 µL	2,5 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 TAQ** é fornecida a 5 U/µL. A quantidade ótima de enzima depende da quantidade da fita molde e o comprimento do produto de PCR. Normalmente, 2,5 U de DNA polimerase por 50 µL de volume de reação apresenta bons resultados, mas as quantidades ótimas podem variar de 1,0 a 2,5 U por reação dependendo do comprimento do fragmento amplificado e dificuldade de amplificação da amostra em particular.

Tampões

A *Ecra Biotec* fornece junto com a **ECRA TAQ** um tampão testado para suas aplicações mais comuns, contendo magnésio em concentração de 20 mM (2 mM na reação de PCR), necessária para uma boa amplificação.

Aditivos de PCR

A concentração de Mg²⁺ é crítica, uma vez que a **ECRA TAQ** 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 Mg²⁺ é de 2 a 4 mM sobre a concentração total de dNTP para PCRs convencionais.

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 baixa ou ampliações maiores que 20 kb.

Molde de DNA

Recomendamos o uso de 10 a 1000 ng/50 µL reação de DNA genômico e 5 a 100 ng/50 µL reação de DNA plasmidial ou viral.

Condições dos ciclos

As condições ótimas podem diferir do protocolo padrão.

Tabela 3. Programação do termociclador

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95 °C	1 min	
Desnaturação	95 °C	5 a 10 s	25 a 35 ciclos
Anelamento dos primers	45 a 68 °C	10 a 30 s	
Extensão	72 °C	1 min/kb	
Extensão final	72 °C	2 a 5 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 TAQ** é capaz de amplificar 1 kb em 1 min.

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 MgCl₂ 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 Mg²⁺.

Especificações

Tampão de armazenamento: Tris-HCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; NP-40 0,1%; Tween20 0,1%; 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 74 °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

Dabrowski, S., & Kur, J. (1998). Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 45, pp. 661–667.

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 TAQ 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@ecrabiotech.com