



## Taq DNA Polimerase

#P1011-1      500U

**Concentração:** 5U/ $\mu$ L

<b>Conteúdo:</b>	Taq DNA Polimerase	100 $\mu$ L
	Tampão 10x de PCR (Mg <sup>2+</sup> plus)	1.25mL
	Tampão de carregamento 6x	1mL
	25mM MgCl <sub>2</sub>	1.25mL

### Armazenar a -20°C

Para uso em pesquisa somente

Total de 3 tubos.

### Descrição

Taq DNA polimerase é uma polimerase de DNA recombinante termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*. Seu peso molecular é de 94 kDa. A Taq DNA polimerase pode amplificar DNA alvo até 5kb (molde simples). A velocidade de extensão é de 0.9~1.2kb/min (70~75°C). Ela tem atividade 5' para 3' mas com atividade 3' para 5' exonuclease ausente que resulta em um produto de PCR contendo extremidades 3'-dA.

### Definição de unidade

Uma unidade é definida como uma quantidade de enzima necessária para catalisar a incorporação de 10 nmole de dNTPs em um formato ácido insolúvel em 30 minutos a 70°C usando DNA de esperma de arenque como substrato.

## **Tampão de armazenamento**

20mM de TrisCl (pH 8.0), 100mM de KCl, 3.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTT, 0.1% de Triton X-100, 0.1% de Tween20, 0.2mg/mL de BSA, 50% (v/v) de glicerol

## **Tampão de PCR 10x com Mg<sup>2+</sup>**

100mM de Tris-HCl(pH 8.8), 500mM de KCl, 1% de Triton X-100,

## **LIMITAÇÃO NO USO DO PRODUTO**

Este produto foi desenvolvido, desenhado e vendido exclusivamente *para propósitos de pesquisa e in vitro somente*. O produto não foi testado para uso em diagnóstico ou para desenvolvimento de drogas, e nem é adequado para a administração em humanos ou animais.

## **Aplicações**

- Amplificação de PCR de fragmentos de DNA de até 5kb
- Marcação de DNA.
- Sequenciamento de DNA.
- PCR para clonagem.

## **Protocolo básico de PCR**

O seguinte protocolo básico serve como um guia geral e ponto de início para qualquer amplificação de PCR. Condições de reação ótimas (tempo de incubação e temperatura, concentração da Taq DNA polimerase, iniciadores, Mg<sup>2+</sup>, e molde de DNA) variam e precisam ser otimizados.

### **1. Adicione os seguintes componentes a um tubo de microcentrifugação estéril sob o gelo:**

#### **1.1 Recomendação de ensaios de PCR com tampão de PCR (Mg<sup>2+</sup> plus)**

Reagente	Quantidade, para reação de 50µL	Concentração final
Água estéril deionizada	Variável	-

Tampão de PCR 10x (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 µL	1x
dNTPs (10mM cada)	1 µL	0.2 mM cada
Iniciador I	variável	0.4-1µM
Iniciador II	variável	0.4-1µM
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0.25-0.5 µL	1.25-2.5U/50 µL
Molde de DNA	variável	10pg-1µg
Total		50µL

### 1.2 Ensaio de PCR recomendado com tampão (livre Mg<sup>2+</sup>)

Reagente	Quantidade, para 50 µL de reação	Concentração final
Água estéril deionizada	variável	-
Tampão de PCR 10x	5µL	1x
dNTPs (10mM cada)	1µL	0.2 mM cada
Iniciador I	variável	0.4-1µM
Iniciador II	variável	0.4-1µM
25mM Mg <sup>2+</sup>	variável	1-4mM
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0.25-0.5 µL	1.25-2.5U/50 µL
Molde de DNA	variável	10pg-1µg
Total		50µL

### Tabela para seleção de volume de 25 mM MgCl<sub>2</sub> em mistura de reação de 50µL:

Concentração final de Mg <sup>2+</sup>	1.0mM	1.5mM	2.0mM	2.5mM	3mM	4mM
Estoque de Mg <sup>2+</sup>	2µL	3µL	4µL	5µL	6µL	8µL

### Recomendações com molde de DNA em um volume de reação de 50µL

DNA genômico humano	0.1 µg-1µg
DNA plasmidial	0.5ng-5ng
DNA fago	0.1ng-10ng
DNA genômico de E.coli	10 ng-100ng

- 2. Tubo contendo mistura de reagentes. Tampe os tubos e centrifugue eles ligeiramente para recolher o conteúdo para o fundo do tubo.**

Quando estiver usando um termo ciclador que não contém tampa aquecida, sobreponha a mistura de reação com 25 µL de óleo mineral.

- 3. Realize 25-35 ciclos de amplificação de PCR como segue:**

Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
25-35 ciclos	94°C 55-68°C 72°C	30 segundos 30 segundos 1 minuto
Extensão final	72°C	10 minutos

- 4. Incuba por 10 minutos adicionais a 72°C e mantenha a reação a 4°C. As amostras podem ser armazenadas a -20°C até o uso.**
- 5. Analise os produtos da amplificação por eletroforese de gel de agarose e visualize marcando com brometo de etídio ou substituto como o DSView ou similar. Use padrões de peso molecular apropriados.**

#### **Notas sobre as condições de ciclagem**

- Taq DNA polimerase recombinante é a enzima de escolha para a maioria das aplicações de PCR.
- A meia-vida da enzima é de >40 minutos em 95°C.
- A taxa de erro da Taq DNA polimerase no PCR é de  $2.2 \times 10^{-5}$  erros por nucleotídeo por ciclo; a precisão (o inverso da taxa de erro) um número médio dos nucleotídeos corretos incorporados antes de ocorrer um erro, é de  $4.5 \times 10^4$  (determinado de acordo ao método modificado aqui descrito).
- A Taq DNA polimerase aceita nucleotídeos modificados (ex. biotina-, digoxigenina-, nucleotídeos marcados com fluorescência) como substratos para síntese de DNA.
- O número de ciclos de PCR depende da quantidade de molde de DNA na mistura da reação sobre o rendimento esperado do produto de PCR. 25-35 ciclos são geralmente suficientes para a maioria das reações de PCR. Pequenas quantidades de molde de entrada podem necessitar 40 ciclos.

## **Diretrizes para prevenir contaminação na reação de PCR**

Durante a PCR mais que 10 milhões de cópias do molde de DNA são gerados. Portanto, maiores cuidados devem ser tomados para evitar contaminação com outros moldes e amplicons que podem estar presentes no ambiente do laboratório. Recomendações gerais para diminuir o risco de contaminação são as seguintes:

- Prepare sua amostra de DNA, ajuste a mistura de PCR, realize a ciclagem termal e analise os produtos de PCR em áreas separadas.
- Ajuste as misturas de DNA em uma cabine de fluxo laminar equipado com luz UV.
- Use luvas novas para purificação de DNA e ajuste da reação.
- Use recipientes de reagentes exclusivos para PCR. Use pipetas de deslocamento positivo, ou use ponteiras com filtros para preparar amostras de DNA e realizar o ajuste do PCR.
- Sempre realize reações de “controle sem molde” (NTC) para checar contaminação

### **Controle de qualidade**

A ausência de endodesoxiribonucleases, exodesoxiribonucleases e ribonucleases é confirmada pelos testes de qualidade apropriados. Amplificações funcionalmente testadas de gene de cópia única de DNA genômico humano.

### **Ensaio de endodesoxiribonuclease**

Nenhuma conversão detectável de DNA circular fechado covalentemente a um DNA cortado foi observado após incubação de 10U da Taq DNA polimerase com 1µg de pBR322 DNA por 4 horas a 37°C e 70°C.

### **Ensaio de exodesoxiribonuclease**

Degradação não detectável de fragmentos de DNA-HindIII lambda foi observada após incubação de 10U da Taq DNA

polimerase com 1µg de DNA digerido por 4 horas a 37°C e 70°C.

### **Ensaio de ribonuclease**

0% de radioatividade total foi liberada na fração solúvel de ácido tricloroacético após a incubação de 10U de Taq DNA polimerase com 1µg de E.coli [3H]-RNA (40000cpm/µg) por 4 horas a 37°C e 70°C.