

ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA



Taq Pol

DNA polimerase termoestável
Thermus aquaticus, recombinante, *E. coli*

Cat. Nº.	Quantidade
<input type="checkbox"/> POL-100XS	250 unidades
<input type="checkbox"/> POL-100S	500 unidades
<input type="checkbox"/> POL-100M	1.000 unidades
<input type="checkbox"/> POL-100L	2 x 1.000 unidades (M)
<input type="checkbox"/> POL-100XL	4 x 1.000 unidades (M)

Definição de unidade:

Uma unidade é definida como a quantidade de enzima requerida para catalisar a incorporação de 10 nmoles de dNTPs em uma forma ácido-insolúvel em 30 minutos a 70 °C.

Concentração:

5 unidades/ μ L

Transporte:

Transportado em blue ice

Condições de armazenamento:

Armazenamento à 20 °C

Apenas para uso *in vitro* !

Condições de armazenamento adicionais:

Evite ciclos de congelamento/descongelamento

Tempo de vida útil:

12 meses

Descrição:

Taq Pol é a enzima DNA polimerase recomendada para reações de PCR de rotina. É otimizada para alta especificidade e garante mínima formação de produtos inespecíficos. O sistema de tampão é recomendado para PCR baseado em placa e pipetagem automatizada. A atividade replicativa de DNA acontece a 72 °C. Cataliza 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.

Conteúdo:

Taq Pol (tampa azul)

5 unidades/ μ L Taq DNA Polimerase em 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween-20, 0.5 % Nonidet P-40, 50% (v/v) Glicerol, pH 8.0 (25 °C)

Taq Reaction Buffer (tampa vermelha) - 10x conc.

200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, pH 8.5 (25 °C)

MgCl₂ Stock Solution (tampa amarela)

25 mM $MgCl_2$

Reação de PCR

O procedimento de PCR descrito abaixo emprega volumes para uma reação de 50 μ L. Para múltiplas reações, prepare um master mix contendo todos os componentes comuns a todas as reações e dispense o volume apropriado em cada tubo de PCR. Na sequência, adicione o DNA molde e os oligos respectivos.

Descongele, misture e centrifugue brevemente todos os componentes antes de sua utilização.

1. Preparo do PCR master mix

Nota: Considere os volumes de todos os componentes listados na etapa abaixo para determinar o volume correto de água a ser colocado.

Componentes	Reação 50 μ L	[final]
Água, grau PCR	To 50 μ l	
10x Taq Reaction Buffer	5 μ l	1X
dNTP (Mix 10 mM)	1 μ l	200 μ M
Taq Pol (5 U/ μ l)	0,2 - 0,5 μ l	1 - 2,5 U/reação
Misture e centrifugue brevemente (spin).		

2. Adicione o DNA molde e os oligos

Componentes	Reação 50 μ L	[final]
Oligo senso (10 μ M)	0,5 - 2,5 μ l	0,1 - 0,5 μ M
Oligo anti-senso (10 μ M)	0,5 - 2,5 μ l	0,1 - 0,5 μ M
DNA molde		10 pg - 1 μ g**

**DNA genômico: 1 ng-1 μ g; DNA plasmidial ou viral: 1 pg-1 ng

Tampe cada tubo, misture e centrifugue brevemente (spin).

DATA SHEET

**Taq Pol**

DNA polimerase termoestável

Thermus aquaticus, recombinante, *E. coli***3. Otimização da concentração de MgCl₂:**

O tampão de reação 10x concentrado contém 20 mM de MgCl₂, resultando em 2 mM na reação, concentração recomendada para maioria das aplicações. Para otimização, adicione MgCl₂ da solução estoque conforme indicado na tabela abaixo.

Concentração final MgCl₂	2,5 mM	3 mM	4 mM
Volume do estoque MgCl₂, 50 µl	1 µl	2 µl	4 µl

4. Incube as reações em termociclador

Condições de ciclagem recomendadas

	Etapa	Temp.	Tempo
	Denaturação inicial	95 °C	1 min
30 cycles	Denaturação	95 °C	15 - 30 sec
	Hibridização ¹	45-68 °C	15 - 30 sec
	Elongação ²	72 °C	30 sec - 4 min
	Elongação final	72 °C	2 min
		4 - 8 °C	

1) A temperatura de hibridização depende dos T_ms dos oligos utilizados.

2) O tempo de elongação depende do tamanho do fragmento que será amplificado, sendo 1 min/kb o tempo recomendado.

Para obtenção de especificidade ótima, otimizações nos parâmetros individuais podem ser necessárias dependendo do DNA molde e do par de oligos empregado.