

INSERTO

Descripción

La enzima genTaq Polimerasa tiene un peso molecular de 94 KDa y es producida a partir de la cepa de E. coli recombinante DH5α pTTQ TaqPol Thermus aquaticus. Está demostrado que la genTaq Polimerasa recombinante es idéntica a la ADN polimerasa natural de Thermus aquaticus, con respecto a su actividad, especificidad, termoestabilidad, fidelidad y procesividad para amplificar ADN in vitro a través de la técnica PCR. La genTaq Polimerasa funciona correctamente en un rango de temperaturas de alineamiento desde 30°C hasta 72°C. genTaq ADN Polimerasa es un producto de alto rendimiento para PCR generando confianza en los resultados a obtener. Este kit contiene la enzima taq polimerasa, el Buffer 10X, el potenciador de la reacción MgCl₂ en concentraciones óptimas.

Producido por:



**LABORATORIO
 DE GENÉTICA**
 Y BIOLOGÍA MOLECULAR LTDA.

Dirección: ClL 134 No. 7B – 83
 Consultorio 123 Edificio El Bosque
 Tels: + 57 1 805 2971 / + 57 1 805 2969
 Cels: +57 310 214 1154 / +57 322 462 3259
 Bogotá – Colombia

Almacenamiento y estabilidad:

genTaq polimerasa debe ser almacenada a -20°C antes y después de su uso.

Transporte:

genTaq Polimerasa debe ser transportada en hielo seco para mantener las condiciones de temperatura en la cadena de frío.

Medidas de seguridad:

genTaq es un reactivo de baja peligrosidad, no posee efectos adversos en mucosas, ni en la piel. Es importante el uso de los elementos de bioseguridad.

Defición de unidad

Una unidad se define como la cantidad de enzima que incorpora cada 10nmol de dNTPs en 30 minutos a 72°C.

Aplicaciones

La genTaq polimerasa ha sido ampliamente utilizada obteniendo los mejores resultados en pruebas de amplificación de ADN In Vitro de cualquier origen Biológico.

Otros componentes del kit

Buffer 10X tampón de reacción:

el tampón de reacción contiene KCl 500mM y Tris-HCl 100mM pH 9.0; la concentración de cada componente ha sido optimizada. Está demostrado que el KCl es un potencializador de la PCR siempre y cuando se encuentre en concentraciones adecuadas máximo de 50mM por reacción ya que concentraciones mayores puede inhibir la misma.

MgCl₂:

De gran importancia para la PCR, ejerce la función de potenciar la reacción, su concentración ha sido ampliamente optimizada para el mejor rendimiento de la prueba, de acuerdo a los parámetros establecidos para la misma. Ayuda a la alineación y reconocimiento por parte de los Primers a la cadena de ADN en concentraciones adecuadas (1.5-2.5 mM).

PROTOCOLO SUGERIDO PARA EL MONTAJE DE LA PCR

Nota:

Las condiciones óptimas para la PCR varían, y son dependientes de los cebadores o primers usados en la reacción y de la calidad del ADN empleado.

REACTIVOS	VOLUMENES POR REACCIÓN O POZO DE PCR				
	Concentración Inicial (La recibida por el cliente en el kit)	Concentración final	Volumen de reacción de 20µL	Volumen de reacción de 30µL	Volumen de reacción de 50µL
Buffer de reacción	10X	1X	2µl	3µl	5µl
MgCl ₂	25mM	1.5mM	1.2µl	1.8µl	3µl
*ADN	50ng/ul	50ng/ul	2µl	3µl	5µl
*Primer F	10uM	0.5ug	1µl	1.5µl	2.5µl
*Primer R	10uM	0.5ug	1µl	1.5µl	2.5µl
*dNTPs	10mM	0.2mM	0,4µl	0.6µl	1µl
genTaq	5U/ul	1U/ul	0.2µl	0.3µl	0.5µl
Agua	-----	-----	12.2µl	18.3µl	3µl

*La concentración de estos reactivos puede variar de acuerdo a la técnica empleada por los investigadores.

*Si el laboratorio no posee pipetas para tomar estos volúmenes, entonces prepare mayores volúmenes de reacción.

RECOMENDACIONES:

Si adiciona colorante a la mezcla maestra recomendada, recuerde restar el volumen de colorante utilizado al volumen de AGUA

indicado en la mezcla; a fin de mantener las concentraciones equimolares en la reacción.

Cuando siembre cada pozo o tubo de reacción adicione el 90% del volumen total por reacción indicado en la mezcla maestra para tener en cuenta el error de Pipeteo.

Si su muestra de ADN contiene trazas de EDTA u otros quelantes del ión Mg ++producto de su aislamiento, recomendamos aumentar la concentración de MgCl₂ en reacción ya que los quelantes disminuyen el ión Mg ++ disponible para la reacción.

CONDICIONES SUGERIDAS PARA LA PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
	94-96°C	30 segundos	30 o más
Anillamiento	Variable	30-40 segundos	
Extensión	72°C	30seg - 1minuto/1kb	
Extensión final (opcional)	72°C	7 minutos	1
Enfriamiento	4°C	±4 minutos	∞

GUÍA DE SOLUCIÓN DE PROBLEMAS:

Problema	Posible causa	Recomendación
Ausencia de producto de amplificación	Falta de un reactivo en la máster	Verificar el volumen de cada reactivo componente del máster.
	Reactivo vencido o defectuoso	Revisar el aspecto, la fecha y la concentración de cada reactivo así como su almacenamiento.
	Falla en los ciclos del termociclador	Revisar la programación del termociclador para así controlar las condiciones del ensayo.
	Disminución de la temperatura en el ciclo de anillamiento	Aumentar el número de ciclos y verificar el gradiente de temperatura óptima.
	Calidad del ADN	El aumento de la concentración de sales y de fenolcloroformo, influye en los resultados de la PCR
	Ciclos de extensión largos	Reducir el número de ciclos
	Temperatura de anillamiento muy baja o muy alta	Verificar la temperatura de anillamiento y aumentarla. Menor rendimiento de la PCR.
Producto de amplificación no específico	Alta concentración de primer	Disminución de la concentración de los primers en la máster.
	Exceso de MgCl ₂ y DNTPs	Mayor concentración de MgCl ₂ inhibe la funcionalidad de la Taq Pol, en menor concentración genera productos inespecíficos. Mayor concentración de DNTPs inhibe los productos de amplificación.
	Montaje de PCR en largo tiempo	Asegúrese que el montaje tenga todas las condiciones como la temperatura y ejecute el montaje en el menor tiempo posible.

Desnaturalización inicial

El paso inicial de la denaturación se da a 95°C por 60 segundos no se recomienda para ADNs complejos como ADN plasmídico o ADNc. Para ADN eucariota la desnaturalización inicial se da hasta de 3 minutos con el fin de facilitar la fusión completa del ADN.

Desnaturalización

Se recomienda 5 ciclos de desnaturalización a 95°C, la cual es adecuada para ADN ricos en GC. Para el bajo contenido de GC (40-45%) se recomienda disminuir 5 segundos el ciclo.

Anillamiento

La temperatura óptima depende de las secuencias de los primers y es generalmente -5°C por debajo de la T_m. Alternativamente se puede utilizar como punto de partida 55°C. Dependiendo de la reacción el tiempo de anillamiento también se puede reducir en 5 segundos el ciclo.

Extensión

El tiempo de extensión depende de la longitud del primer y la complejidad de ADN. Con un ADN de baja complejidad como el ADN plasmídico, un tiempo de extensión de 10 segundos es suficiente para un primer de 1kb o hasta 5kb. Para la amplificación de fragmentos de más de 1kb partir de un ADN de alta complejidad, tales como ADN genómico eucariótico, se recomienda incrementar el tiempo de extensión sucesivamente hasta 30s/kb con el fin de encontrar más rápido la condición óptima para el primer.

Soporte técnico:

Si la guía de solución de problemas no resuelve la dificultad que tiene con su ensayo, contacte su distribuidor local o nuestro apoyo técnico con los detalles de configuración de la reacción, ciclos y las condiciones del experimento.

Correo electrónico:

info@genetica.com.co

Tels: + 57 1 805 2971 – + 57 1 805 2969

Cels: +57 310 214 1154 – +57 322 462 3259