AGRO Taq

Kit para la amplificación de moléculas de ADN mediante PCR directa partir de muestras vegetales.

PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

http://www.pb-l.com.ar

Agro Taq

Cat. no. EA11

Contenido	EA1101 100 U	EA1102 500 U
Agro Taq 4U/µl	100 U	500 U
Buffer Agro Taq 2×	1 ml	1 ml x5
Buffer de dilución	1,25 ml	1,25 ml x2
Primers control 10X	50 µl	250 µl
Agua ultrapura - Libre de nucleasas	1500 µl	1500 µl x5
Manual	1	1

Almacenamiento

Almacenar a -20 °C.

Aclaración

Este producto ha sido desarrollado para su uso exclusivo en investigación. No apto para uso in vitro en ensayos con animales o humanos.

Descripción

Agro Taq, es una ADN polimerasa termoestable modificada y desarrollada para la amplificación de moléculas de ADN mediante PCR directa a partir de hojas de plantas, sin necesidad de realizar una purificación de ADN previa. Como material de partida se pueden utilizar hojas frescas, almacenadas a 4 °C ó -20 °C.

La enzima ADN polimerasa provista en el kit está desarrollada para ser resistente a inhibidores presentes en muestras vegetales. Para la amplificación de la muestra es posible utilizar dos estrategias: muestra directa o dilución.

La estrategia de muestra directa permite utilizar, como material de partida, pequeños fragmentos de hoja directamente como molde de reacción. Por otro lado, la segunda alternativa se basa en un pretratamiento de la hoja en buffer de dilución incluido en este sistema. Ésta es una alternativa óptima para muestras difíciles (hojas fibrosas, viejas) y/o poca cantidad de muestra.

Notas importantes

-Limpie la herramienta de corte entre el seccionamiento de una muestra y otra.

-Utilice el buffer de dilución para muestras difíciles (hojas fibrosas o que no presentan amplificación mediante la alternativa de muestra directa).

-Incorpore la muestra al tubo de reacción como último componente.

Protocolo

Muestra directa

Tomar una muestra de hoja de 0,5 - 1 mm de diámetro e introducirla directamente en el tubo de reacción. Se puede utilizar la punta de un tip p1000 cortada como herramienta de corte.

Protocolo "dilución"

Tomar una muestra de hoja de 2 - 5 mm de diámetro e introducirla en un tubo conteniendo 20 µl de buffer de dilución. Si el fragmento es mayor, incrementar el volumen de buffer de dilución a 50 µl.

. Presionar con el tip el fragmento vegetal contra las paredes del tubo (la solución debería colorearse de verde). Utilizar 0,5 µl del sobrenadante como molde de la reacción de PCR.

Primers Control 10X

Este producto contiene un par de *primers* control específico para un gen conservado de cloroplastos. Los mismos se utilizan sobre la muestra de interés de forma paralela a la muestra conteniendo los *primers* específicos. El producto de amplificación de los *primers* control es un fragmento de 297 pb. Los mismos poseen una temperatura de melting de 62 °C.

Control positivo de reacción

Al momento de realizar la optimización de la reacción sobre una muestra, es recomendable utilizar un control positivo usando como molde el ADN previamente purificado. Si en el control positivo no se obtiene amplificación las condiciones de reacción (concentración de los *primers*, temperatura de *annealing* o extensión, etc.) deberán ser optimizadas.

Ejemplo de una reacción estándar:

	Muestra	Control
Molde	Hoja ó 0,5 ul	Hoja ó 0,5 ul
Primer 1 (10 µM)	1 µl	-
Primer 2 (10 µM)	1 µl	-
Primers Control 10X	-	2 µl
Buffer AgroTaq 2X	10 µl	10 µl
dNTP (2 mM)	2 µl	2 µl
Agro Taq (4 U/µl)	0,25 µl	0,25 µl
Agua Ultrapura – Libre de nucleasas	5,25 µl	5,25 µl

Perfil de ciclado

94ºC, 5 min	
94ºC, 30 seg 55-65ºC, 30 seg 72ºC, 1kpb/min	30-35 ciclos
72ºC, 5 min	

Nota: Las condiciones de reacción y el perfil de ciclado se encuentran optimizados para una reacción estándar, pero es posible que deban ser modificados según los primers y el molde target.