



Taq *Extensa*

ADN polimerasa para amplificación por
PCR de fragmentos de alto peso molecular



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

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

Taq Extensa

Cat. Nº EA20

Contenido	EA2001 100 U	EA2002 250 U
Taq Extensa (4U/μl)	25 μl	62,5 μl
Buffer Extensa 5×	500 μl	1300 μl
Solución Booster 5×	500 μl	1300 μl
MgCl ₂ 50mM	1 ml	1 ml
Agua ultrapura Libre de nucleasas	1,5 ml	1,5 ml x2
Protocolo	1	1

Almacenamiento

Taq Extensa puede ser almacenada a -20 °C durante 24 meses.

Aclaración

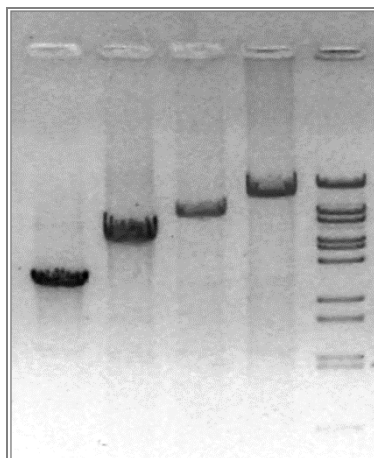
Este producto ha sido desarrollado para su uso exclusivo en investigación. No apto para uso in vitro en ensayos con animales o humanos.

Descripción

La ADN Polimerasa Taq Extensa fue desarrollada específicamente para la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular. Esta enzima es *HotStart* y posee actividad exonucleasa 3'-5' (*proofreading*).

La gran procesividad y la alta eficiencia de amplificación, combinadas con una fidelidad dos veces mayor respecto de otras ADNs polimerasas termoestables, hacen que esta enzima sea óptima para

la amplificación de fragmentos de ADN de alto peso molecular (hasta 20 kpb). Además, permite la amplificación de moldes de alta y baja complejidad, conteniendo subsecuencias homopoliméricas o con alto contenido de GC.



Amplificación por PCR de fragmentos específicos de 3kpb, 5kpb, 7kpb y 10kpb a partir de genoma purificado del bacteriófago Lambda. Marcador de peso molecular Lambda BstEII (#M0801)

Los productos de PCR obtenidos con la polimerasa Taq *Extensa* pueden ser utilizados directamente para el clonado T/A.

Aplicaciones

Amplificación por PCR de fragmentos de alto peso molecular (hasta 20 kpb) y moldes con alto contenido de GC.

Buffer *Extensa* 5x

El buffer de reacción está diseñado especialmente para proteger el ADN de eventos de depurinación y/o ruptura durante el ciclado

térmico. El mismo contiene una concentración final de $MgCl_2$ en el tubo de reacción de 3,5 mM, el cual puede ser ajustado según los requerimientos de cada reacción utilizando $MgCl_2$ 50 mM, provisto en este kit.

Solución *Booster 5x*

En la mayoría de los amplicones el buffer de reacción *Extensa 5x* contenido en este kit es apropiado, sin embargo, para productos de PCR con alto contenido de GC, moldes con gran estructura secundaria o reacciones con baja eficiencia de amplificación, se aconseja la adición de la solución *Booster 5X* incluida en este kit.

Definición de Unidad

Una (1) unidad de Taq *Extensa* se define como la cantidad de enzima necesaria para incorporar 10 nmol de dNTPs en 30 minutos de reacción a 74 °C.

Buffer Storage

20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCl, 50% Glicerol.

Controles de calidad

La ADN polimerasa Taq *Extensa* está certificada de ser libre de DNasas (endo- y exonucleasas). Posee una pureza mayor al 95%.

Consideraciones antes de comenzar la reacción

Descongelar todos los componentes del kit, homogenizar y centrifugar antes de comenzar el armado de la reacción. Preferentemente utilizar tubos de PCR de pared delgada.

Si observa pérdida de volumen luego de la reacción de PCR, colocar una gota (30 µl) de aceite mineral sobre la superficie del líquido para evitar la evaporación. Luego del ciclado, recuperar el volumen de la fase inferior.

Diseño de los *primers*

Se aconseja utilizar *primers* de 30-35 nt de longitud, con un contenido de GC 40-60% distribuido a lo largo de todo el oligonucleótido.

Al igual que una reacción de PCR convencional se recomienda evitar regiones de complementariedad intramolecular (en la misma molécula de *primer*) e intermolecular (entre ambas moléculas de *primer*). De igual modo, no incluir regiones con repeticiones directas, para disminuir la posibilidad de dimerización entre los *primers* o formación de *hairpins*.

En el caso de utilizar *primers* degenerados, incluir en el extremo 3' del *primer* al menos 3 nucleótidos conservados.

Si desea recibir información adicional respecto al diseño de los *primers*, escribir a: serviciotecnico@pb-l.com.ar

Consideraciones respecto al molde de ADN

En la mayoría de las aplicaciones donde el molde de PCR es un plásmido o un fragmento de ADN menor a 10 kpb, es conveniente utilizar 1-50 ng por tubo de reacción. Y en el caso de utilizar genomas o moléculas con alto contenido de estructura secundaria se aconseja incluir en la reacción 0,1-1 µg.

Para la optimización de la concentración de molde es importante tener en cuenta que, si la cantidad de molde es demasiado alta, aumenta la posibilidad de obtener productos de PCR no específicos.

Por otro lado, si la cantidad de molde es muy baja, es posible obtener un menor rendimiento en el producto.

Se recomienda utilizar moldes de alta calidad, pureza e integridad, así como también evitar el congelado/descongelado de los mismos. Si las moléculas molde están dañadas es posible obtener productos de bajo peso molecular con un alto contenido de ruido en la reacción. Es aconsejable que el molde sea purificado con una alta concentración, tal que el volumen introducido en el tubo de reacción sea pequeño, lo que disminuye la potencial presencia de inhibidores. Para moldes provenientes de una reacción de RT-PCR, el volumen de ADNc molde no debe superar el 10% del volumen final de la reacción.

Parámetros del perfil de ciclado

Desnaturalización

Al comienzo de la reacción es importante desnaturalizar completamente el molde de ADN utilizando 1-5 min a 92-94 °C. Si el molde que está utilizando posee un contenido de GC mayor al 50%, es conveniente extender este tiempo a 10 min. Sin embargo, se recomienda utilizar tiempos de desnaturalización tan cortos como sea posible para prevenir la depurinación y evitar la aparición de productos de PCR de bajo peso molecular. Luego de la etapa inicial, es conveniente utilizar tiempos de desnaturalización de 5-10 seg.

Hibridación/extensión

La temperatura de hibridación de los *primers* es dependiente de la longitud y el contenido de GC de los mismos. Si los *primers* poseen una T_m menor a 68 °C, se deberá utilizar un perfil de tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión). Sin embargo, cuando

los *primers* son mayores a 30 nt la T_m suele estar cercana a la temperatura de extensión 68°C. En estos casos, es posible utilizar un perfil de ciclado de dos pasos (desnaturalización e hibridación/extensión), disminuyendo así los tiempos de reacción. En ambos casos el tiempo de extensión recomendado es 1000 pb/min a 68 °C.

Para fragmentos mayores a 15 kpb, se recomienda prolongar 10-20 segundos el tiempo de extensión en cada ciclo, luego del ciclo 11.

Número de ciclos

El número de ciclos aconsejado es entre 20-30, dependiendo del tamaño del producto y la complejidad del molde. Sin embargo, como regla general se recomienda utilizar un menor número de ciclos para los productos de alto peso molecular (≥ 10 kpb, 20-25 ciclos), y un mayor número de ciclos (25-30) para productos de menor tamaño (≤ 10 kpb).

Ejemplo de una reacción estándar:

Reactivos	Concentración final	Volumen
ADN Molde	<1,000 ng	1 μ l (1 ng)
<i>Primer Fw</i> (10 μ M)	0,1-1 μ M	1,25 μ l (0,5 μ M)
<i>Primer Rev</i> (10 μ M)	0,1-1 μ M	1,25 μ l (0,5 μ M)
Buffer <i>Extensa</i> 5x	1x	5 μ l
Solución <i>Booster</i> 5x	1x	5 μ l
dNTPs (2,5 mM)	250-500 μ M	2,5 μ l (250 μ M)
Taq <i>Extensa</i> (4 U/ μ l)	1-2 U	0,25 μ l (1 U)
Agua ultrapura Libre de nucleasas	Hasta 25 μ l	-

Perfil de ciclado

92 °C, 5 min	20-30 ciclos
92 °C, 5-10 seg	
55-65 °C, 15 seg	
68 °C, 1kpb/min	
68 °C, 5 min	

Nota: las condiciones de reacción y el perfil de ciclado deberán ser optimizados según cada par de *primers*:molde