

Universal PCR Kit

No.Catálogo: MBL242 (500 U, 5 U/ μ L)

Versión: 07/2006

Kit de PCR que contiene la MBL-Taq polimerasa, 5 tampones de reacción y 2 potenciadores de la PCR. Recomendado para laboratorios que emplean PCRs con distintos primers de modo rutinario, para optimizar las amplificaciones y para investigadores que desean encontrar rápidamente las condiciones óptimas de una "nueva PCR".

Fuente: La MBL-Taq polimerasa (5U/ μ L) está purificada a partir de una cepa de *E. coli* portadora de un plásmido hiperproductor de una polimerasa aislada de la bacteria *Thermus sp.*

Condiciones de ensayo: 25mM Tris-HCl pH9,0 a 25°C, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,1mg/mL de gelatina, 200 μ M de dATP, dGTP, dTTP, 100 μ M [α^{32} -P]dCTP (0,05 μ Ci/nmol) y 12,5 μ g de ADN activado de espermatozoos de salmón.

Definición de Unidad: Una unidad se define como la cantidad de enzima que se requiere para convertir 10 nmoles de dNTPs en 30 minutos a 74°C a un polímero insoluble en ácidos.

Actividades asociadas: La enzima tiene actividad exonucleasa 5'-3' asociada a la polimerización pero no tiene actividad exonucleasa 3'-5' (actividad correctora). Permite la clonación T/A.

Aplicaciones y controles de calidad: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Enzima purificada libre de endonucleasas y exonucleasas. SDS-PAGE- banda de 95kD, >98% pura. La actividad y estabilidad han sido ensayadas en 35 ciclos de hasta 96°C. La tasa de error de la enzima por nucleótido y por ciclo es de aproximadamente 1-2 errores/12000 pares de base. La vida media estimada de la enzima a 96°C es de 1,5 horas.

1. Buffer A 10x: contiene Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄ y potenciadores de la PCR; pH=9,4. Ideal para PCRs con DNA "sucio", para amplificar DNAs con alto porcentaje en bases GC, para PCRs de muestras valiosas en las que es importante un altísimo porcentaje de PCRs positivas y para PCR a tiempo real.

2. Buffer B 10x: contiene Tris-HCl, KCl y BSA; pH=8,9. Recomendado para PCR a tiempo real; en ciertos casos el BSA facilita la PCR al unirse y bloquear a inhibidores presentes en la reacción debido a DNAs parcialmente purificados. Cuando se usa SYBR Green I, en la PCR a tiempo real, es necesario aumentar la concentración de MgCl₂ 0,5mM más que en una PCR estándar.

3. Buffer C 10x: contiene Tris-HCl y KCl; pH=8,3. Tampón recomendado para RAPD. Este tampón de reacción permite aumentar la concentración de MgCl₂, el cual debe usarse en reacciones de RAPD de 3,5 - 5 mM final.

4. Buffer D 10x: contiene Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄ y KCl; pH=9,0. Para amplificaciones en presencia de (NH₄)₂SO₄ y en ausencia de detergentes.

5. Buffer E 10x: contiene Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄ y detergentes; pH=9,4. Para amplificaciones en ausencia de KCl y en presencia de detergentes y (NH₄)₂SO₄.

Además del Buffer Red 10x, Dominion-MBL dispone del kit MBL-Red Taq polimerasa 2,5x (MBL152) que simplifica la preparación de una reacción de PCR y su posterior aplicación en un gel de agarosa.

El kit está compuesto de una mezcla de reacción 2,5x que contiene todos los reactivos necesarios para que ocurra la PCR y un agente densificante con frente de carga para aplicar directamente el producto de PCR en un gel de agarosa.

Potenciadores de la PCR

1. MBL-GC Enhancer 10x (MBL154): Permite la amplificación de moldes con un alto contenido GC. Se puede emplear a concentraciones finales de 1, 2 y 3x, amplificando con éxito fragmentos de hasta un 72% GC.

2. MBL-Y Enhancer 10x (MBL164): Permite aumentar la cantidad del fragmento a amplificar. Combinado con el MBL-GC Enhancer es posible amplificar fragmentos de un 80% GC.

Recomendamos almacenar los tampones de reacción y el MgCl₂ 25mM a -20 °C.

Envío y almacenamiento del producto: El envío del producto a temperatura ambiente no afecta su actividad, sin embargo el almacenamiento de rutina a -20 °C es altamente recomendado.

Condiciones de uso recomendadas

	Concentración final
2 µL 10x PCR Buffer sin Mg ²⁺	1x
1,6-2 µL MgCl ₂ (25 mM)	2-2,5 mM
2 µL dNTPs (2 mM cada uno=8 mM total) ^a	200 µM cada uno
1 µL primer 1 (15 pmol/µL=15 nmol/mL=15 µmol/L=15 µM)	0,75 pmol/µL
1 µL primer 2 (15 pmol/µL=15 nmol/mL=15 µmol/L=15 µM)	0,75 pmol/µL
x µL molde (plásmidos: 30-75ng; gDNA: 100-500ng)	
0,2 µL MBL-Taq DNA polimerasa (5 U/µL) ^b	1 U
H ₂ O hasta 20 µL	

Programar: 94°C 5:00, 25-30x (94°C 0:35, Tm 0:35, 72°C 1'/kb), 72°C 7:00, 4°C ∞

^a La concentración de magnesio debe ser aumentada si se trabaja con RAPDs a 3,5-5 mM final o con SYBR-Green I 0,5 mM más que en una PCR estándar

^b La concentración final de dNTPs influye de una forma muy importante en la PCR, ya que los dNTPs se unen al ión magnesio y reducen su concentración efectiva en la reacción. Experimentos previos han demostrado que concentraciones 4 veces superiores a las recomendadas pueden anular casi por completo la amplificación.