

ECRA TUPAM HIFI 2X

Master mix para PCR de alta fidelidade

Quantidade 100 U; Concentração 0,04 U/ μ L; Código do produto: EB1-22



Validade 6 meses após a abertura ou o máximo de acordo com o COA.

Temperatura de transporte: -20 °C a 10 °C.

Temperatura de armazenamento: -20 °C.

Descrição do produto

A Tecnologia de Único Passo para Análise Molecular (**ECRA TUPAM HIFI 2X**) é uma mistura para PCR contendo a DNA polimerase de *Pyrococcus* sp., com atividade otimizada e alta fidelidade. Trata-se de uma conveniente mistura 2X contendo todos os reagentes necessários para a realização da PCR (com exceção dos primers e DNA molde). A formulação contém a ECRA HIFI DNA polimerase (EB1-17), nucleotídeos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão de reação patenteado incluindo MgCl₂ e estabilizantes. A **ECRA TUPAM HIFI 2X** deve ser empregada na concentração de 1X em reações de PCR de 20 a 50 μ L. O Master mix é recomendado para reações de PCR rotina a partir de soluções puras de DNA, colônias bacterianas e cDNA. Além disso, a formulação exclusiva da ECRA Biotec garante alta especificidade e o mínimo de formação de subprodutos.

Diretrizes para o uso da ECRA TUPAM HIFI 2X

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (μ L)	Cor
ECRA TUPAM HIFI 2X	2 x 1250	Azul
DMSO	250	Amarelo

Condições de reação básicas para PCR

Descongele todos os componentes necessários para a reação apenas no momento de sua utilização.

Tabela 2. Protocolo para montagem da reação

Componente	Volume 50 μ l	Volume 20 μ l	Conc. final
ECRA TUPAM HIFI 2X	25 μ l	10 μ l	1X
Primer F	x μ l	x μ l	0,5 μ M
Primer R	x μ l	x μ l	0,5 μ M
DMSO**	1,5 μ l	0,6 μ l	3%
DNA molde	y μ l	y μ l	
H ₂ O	para 50 μ l	para 20 μ l	

* A concentração final de 0,5 μ M de primers pode variar entre 0,2 e 1,0 μ M, se necessário;

** A adição de DMSO é opcional.

Notas sobre componentes reacionais

A **ECRA TUPAM HIFI 2X** é fornecida a 0,04 U/ μ L (1 U/reação) de enzima; 2X Tampão HIFI de reação contendo magnésio, necessário para uma boa amplificação (2.75 1X) e cada dNTP. O mix é livre de nucleases e DNA residual. A adição de DMSO ajuda na desnaturação de fitas de DNA com alta proporção de GC, sendo recomendada para estes casos. Ela deve ser evitada para moldes com GC% muito baixo ou amplificações maiores que 20 kb.

Molde de DNA

Recomendamos o uso de 10 a 100 ng/50 μ L reação de DNA de baixa complexidade (como plasmídeos, DNA lambda ou BAC) e 50 a 200 ng/50 μ L reação de DNA genômico de alta complexidade.

Condições dos ciclos

As condições ótimas podem diferir do protocolo padrão.

Tabela 3. Programação do termociclador

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	98 °C	30 s	
Desnaturação	98 °C	5 a 10 s	25 a 35 ciclos
Anelamento dos primers	X °C	10 a 30 s	
Extensão	72 °C	30 s/kb	
Extensão final	72 °C	5 a 10 min	
Término	4 °C		

Alinhamento dos primers

Para que os primers utilizados se alinhem corretamente no DNA molde, uma temperatura condizente com as características dos mesmos deve ser utilizada. Uma temperatura muito alta resultará em pouca ou nenhuma amplificação e uma temperatura muito baixa em inespecificidade no anelamento. Analise seus primers em: <https://tmcaculator.neb.com>.

Extensão

O tempo de extensão depende principalmente do comprimento do fragmento a ser amplificado. A preparação enzimática ECRA TUPAM HIFI 2X é capaz de amplificar 1 kb em 30 s.

Resolução de problemas

Nenhum produto de PCR ou baixo rendimento

- Use mais DNA molde e certifique-se de que não esteja degradado;
- Aumente o número de ciclos, prolongue o tempo de extensão e otimize a temperatura de anelamento dos primers;
- Adicione DMSO ou MgCl₂ na reação;
- Verifique o estado dos primers e se os mesmos não formam dímeros ou *hairpins*;

Produtos não específicos

- Use menos DNA molde e certifique-se de que não está contaminado;
- Aumente a temperatura de anelamento dos

primers, encurte o tempo de extensão e reduza o número de ciclos;

- Verifique o desenho dos primers e se os mesmos não anelam em outros locais do molde;

Referências

Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M., Vander. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res.* 32: 1197-1207. Breslauer et al., (1986) *PNAS* 83, 3746-3750.

Garantia

A *ECRA Biotec* garante que seus produtos atendem às especificações indicadas na seção de dados técnicos. Substituiremos os produtos gratuitamente se não estiverem conforme as especificações. Esta substituição deve ser feita dentro do prazo de 60 dias após o recebimento. Em consideração aos compromissos acima referidos pela *ECRA Biotec*, o comprador concorda e aceita as seguintes condições:

- Que esta garantia substitui todas as outras garantias, expressas ou implícitas;
- Que único recurso do comprador será para obter a substituição do produto de forma gratuita.

Uso para a pesquisa

Estes produtos se destinam a fins de pesquisa por pessoas qualificadas.

Aviso aos usuários

É de responsabilidade do usuário utilizar os produtos da *ECRA Biotec* para determinar por si próprio a adequação de qualquer material e/ou procedimento para uma finalidade específica e que adote as precauções de segurança que possam ser necessárias.

ECRA TUPAM HIFI 2X é uma marca comercial da *ECRA Biotec*.

Versão 5 (Fev/2023)