

## ECRA TAQ 2.0

### DNA polimerase termoestável para PCR

Quantidade 250 U; Código do produto: EB5-20



Validade 18 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 **ECRA TAQ 2.0** é uma DNA polimerase destinadas a todos os tipos de reações de PCR e PCR Real-Time. Esta enzima recombinante originária de *Thermus aquaticus* possui mutações que provem uma atividade superior e mais robusta em relação as enzimas mais comuns do mercado. O produto **ECRA TAQ 2.0** possui formulação otimizada para garantir alta especificidade, sensibilidade, eficiência, resistência a inibidores de reação, e mínima formação de produtos inespecíficos (sistema *Hotstart* intrínseco), além de ser tratada para remoção de DNA residual. A enzima **ECRA TAQ 2.0** catalisa a polimerização de nucleotídeos em dupla fita de DNA na direção 5'→3' na presença de magnésio. Também possui atividade exonuclease no sentido 5'→3' dependente de polimerização, E possuindo ausência de atividade exonuclease 3'→5'. O kit é compatível para o sistema de uso de sondas e para equipamentos de PCR convencional ou quantitativo.

#### Diretrizes para o uso da ECRA TAQ2.0

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	VOLUME (µL)	Cor
ECRA TAQ 2.0	50	Azul
Tampão TAQ 2.0	1800	Vermelho
H <sub>2</sub> O	1800	Branco

#### Condições de reação básicas para PCR

Descongele todos os componentes necessários para a reação, com exceção da enzima, que deve ser mantida em gelo e de preferência ser retirada do estoque apenas no momento de sua utilização. É possível que ocorra a formação de precipitado nos tubos de tampão. Cuidadosamente misture e centrifugue os tubos antes de abri-los. As reações de PCR

devem ser preparadas preferencialmente em gelo. A **ECRA TAQ 2.0** possui uma viscosidade maior e, portanto, deve ser pipetada cuidadosamente. De preferência, adicione a enzima por último na montagem das reações.

Tabela 2. Protocolo para montagem da reação

Componente	VOLUME 50 µL	VOLUME 20 µL	Conc. final
Tampão TAQ 10X	5 µL	2 µL	1X
dNTP 10 mM	1 µL	0,4 µL	200 µM
Primer F	X µL	X µL	0,5 µM
Primer R	X µL	X µL	0,5 µM
DNA molde	Y µL	Y µL	
ECRA TAQ 2.0	0,67 µL	0,25 µL	5 U/µL
H <sub>2</sub> O	para 50 µL	para 20 µL	

\* A concentração final de 0,5 µM de primers pode variar entre 0,2 e 1,0 µM, se necessário.

#### Notas sobre componentes reacionais

##### Enzima

A **ECRA TAQ 2.0** é fornecida a 5 U/µL. A quantidade ótima de enzima depende da quantidade da fita molde e o comprimento do produto de PCR. Normalmente, 2,5 U de DNA polimerase por 50 µL de volume de reação apresenta bons resultados, mas as quantidades ótimas podem variar de 1,0 a 2,5 U por reação dependendo do comprimento do fragmento amplificado e dificuldade de amplificação da amostra em particular.

##### Tampões

A *Ecra Biotec* fornece junto com a **ECRA TAQ 2.0** um tampão testado para suas aplicações em PCR convencional e PCR Real-Time contendo magnésio em concentração de 20 mM (2 mM na reação de PCR), adequado para bons resultados.

##### Aditivos de PCR

A concentração de Mg<sup>2+</sup> é crítica, uma vez que a **ECRA TAQ 2.0** é uma enzima dependente de magnésio. Por outro lado, seu excesso

estabiliza a dupla fita de DNA e impede sua desnaturação completa, podendo também diminuir a especificidade da reação. Em geral, a concentração ótima de  $Mg^{2+}$  é de 2 a 4 mM sobre a concentração total de dNTP para PCR. A adição de DMSO e ou Betaina (reagentes não fornecidos) 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 baixa ou ampliações maiores que 20 kb.

### Molde de DNA

Recomendamos o uso de 0,01ng a 1000 ng/20  $\mu$ L reação de DNA genômico e 0,01 a 100 ng/20  $\mu$ L reação de DNA plasmidial ou viral. Sendo a **ECRA TAQ2.0** uma enzima eficiente com baixas concentrações de DNA (entre 0,001ng/uL e 0,01ng/ul)

### Condições dos ciclos

As condições ótimas podem diferir do protocolo padrão.

**Tabela 3. Programação do termociclador**

Etapas	Temperatura	Tempo	
<b>Desnaturação inicial</b>	95 °C	1 min	
<b>Desnaturação</b>	95 °C	5 a 10 s	25 a 35 ciclos
<b>Anelamento dos primers</b>	45 a 68 °C	10 a 30 s	
<b>Extensão</b>	72 °C- 68°C	30s/kb	
<b>Extensão final</b>	72 °C- 68°C	1 a 2 min	
<b>Término</b>	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.

### Sistema TaqMan

A enzima **ECRA TAQ 2.0** é uma enzima compatível com o sistema TaqMan, devido a sua atividade exonuclease 5'-3'.

### Extensão

O tempo de extensão depende principalmente do comprimento do fragmento a ser amplificado. A enzima **ECRA TAQ 2.0** é capaz de amplificar fragmentos até 5kbp, com uma velocidade de 1 kb por 30 segundos.

### 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;
- Use dNTP de alta qualidade e não use misturas de dNTP que contenham dUTP;
- Adicione DMSO (reagente não fornecido) e  $MgCl_2$  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;
- Reduza a concentração de primers , otimize a concentração de  $Mg^{2+}$  e temperaturas de anelamento.

### Especificações

**Tampão de armazenamento:** Tris-; EDTA; NP-40; Tween20; DTT; glicerol; pH 8,0.

**H<sub>2</sub>O:** a água fornecida pela *ECRA biotec* é tratada para eliminação de nucleases.

**Definição de unidade:** Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que irá incorporar, a 74 °C, 10 nmol de dNTP em 30 min sob as condições de ensaio estabelecidas. O ensaio foi realizado através de comparação com DNA polimerases de atividade já

mensurada.

### Referências

Dabrowski, S., & Kur, J. (1998). Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). Acta Biochimica Polonica, Vol. 45, pp. 661–667.

### 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 TAQ 2.0** é uma marca comercial da *ECRA Biotec*.

Versão 1 (Abr/2023)

---

ECRA Biotec Serviços e Pesquisas LTDA. | Contato: sic@ecrabiotech.com | Tel.: (11) 91365-1996  
Estr. Giuseppina Vianelli Di Napolli, 1455, Conj W8, Campinas - SP 13086-530