

BioMixCell PCR MasterMix (Dye)

V.01

Cód.: MIX002-XS (50 reações)
 MIX002-S (100 reações)
 MIX002-M (250 reações)
 MIX002-L (500 reações)

Componente	MIX002-XS	MIX002-S	MIX002-M	MIX002-L
	50 rxs	100 rxs	250 rx	500 rx
2 X PCR MasterMix (Dye)	1,25 mL	2,5 mL	2 x 3,125 mL	3 x 4,16 mL
ddH2O	1,25 mL	2,5 mL	2 x 3,125 mL	3 x 4,16 mL

Nota: 2 X PCR MasterMix (Dye) contém Taq DNA Polimerase, 3 mM MgCl₂ e 400 µM dNTP mix.

Apenas para uso em pesquisa.

Armazenamento:

Armazenar entre -25°C e -15°C.

Especificações: BioMixCell PCR MasterMix (Dye) é uma solução 2× concentrada para PCR. Este produto já contém o corante (azul) para que a análise por gel de eletroforese possa ser realizada diretamente após a reação. Um *mastermix* que proporciona estabilidade ao sistema de reação, permitindo bons resultados em mais de 98% dos casos e permitindo a execução de reações com modelos e *templates* complicados. É de fácil utilização e pode evitar erros e contaminação no preparo das reações. BioMixCell PCR MasterMix (Dye) catalisa a adição de um resíduo de adenina à extremidade 3' de ambas as fitas das moléculas de DNA, o que o torna adequado para clonagem TA. É principalmente adequado para experimentos de PCR convencionais e clonagem de genes que exijam alta fidelidade.

Instruções:

A seguir está um exemplo de um sistema de reação e condições de PCR para amplificação de um fragmento de 1 kb usando DNA genômico humano como "template". O protocolo básico a seguir serve como orientação geral e ponto de partida para qualquer amplificação por PCR. Condições ideais de reação (tempos e temperaturas de incubação, concentração de PCR MasterMix, *primers* e DNA *template*) variam e precisam ser otimizados de acordo com o *template*, estrutura dos *primers* e tamanho do fragmento alvo.

1. Preparo da reação

Componentes	Volume	Concentração Final
ddH2O	q.s.p. 50 µl	-
2 X PCR MasterMix (Dye)	25 µl	1x
<i>Forward primer</i> (10 µM)	2 µL	0.4 µM
<i>Reverse primer</i> (10 µM)	2 µL	0.4 µM
DNA <i>template</i>	< 0.5 µg	< 0.5 µg/reação

Fabricado por: **Biocell Biotecnologia LTDA**

Rua Japão, nº 100 – A – Alto Barroca

Belo Horizonte/MG - CEP: 30.431-048

Responsável Técnico: Marlon Teodoro Martins

CRF/MG.: 33605

SAC: comercial@biocellbio.com.br | +55 31 2526-6111

Nota:

- A. **Concentração final de primers:** A concentração ótima de *primers* é entre 0.1 - 1.0 μM por *primer*. A utilização de concentrações mais elevadas de *primers* pode ter efeito no aumento da amplificação. Uma concentração mais baixa de *primers* pode garantir um produto de reação mais limpo e um menor *background*.

2. Protocolo

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-desnaturação	94°C	2 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	} 25 - 35
Anelamento	55 – 65°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Extensão Final	72°C	2 min	1

- A. **Tempo de extensão:** O tempo de extensão da PCR depende da sequência do gene alvo a ser amplificada. A Taq DNA Polimerase contida no PCR MasterMix apresenta a velocidade de 2 kb de DNA/minuto.
- B. **Temperatura de anelamento:** A temperatura de anelamento recomendada é de aproximadamente 5°C abaixo da T_m . Se bandas extras forem observadas, temperaturas de anelamento mais altas devem ser consideradas. A ausência do produto pode indicar a necessidade de uma temperatura de anelamento mais baixa.
- C. **Número de ciclos:** O número de ciclos vai depender basicamente das aplicações *downstream* desejadas para o produto de PCR. Se o número de ciclos for alto, a probabilidade do surgimento de um *background* de amplificação não específica aumenta. Portanto, o número de ciclos deve ser reduzido até o ponto que garanta o rendimento necessário do produto.