

Hot Start Master mix 4B para PCR

Versão: 1 13/03/2023

Descrição

O **Hot Start Master mix 4B** para PCR da *pht* possui alta eficácia e estabilidade, ele é composto por todos os reagentes necessários para realização da reação de PCR, com exceção dos primers e do DNA molde. A alta qualidade de nosso **Hot Start Master mix 4B** se deve principalmente a utilização da **Taq-pht**, uma DNA polimerase recombinante de alta termo estabilidade.

O nosso **Hot Start Master mix 4B** para PCR é comercializado na concentração de **2X**, propicia a característica hot start a reação, sem a necessidade de anticorpos. já possuindo MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dTTP e enzima termoestável Taq DNA Polimerase além de um tampão especializado para maximizar a eficácia da sua reação.

Apresentação

- Um frasco de 1250µl de **Hot Start Master mix 4B** para PCR suficiente para 100 reações de volume final de 25ul. **Esse Master mix possui um precipitado insolúvel.**

Código: R4

Tipo de produto final: DNA amplificado (amplicon, produto de PCR).

No. de Reações: 100 reações de volume final de 25 microlitros.

Tipo de amostra: DNA ou cDNA purificado.

Técnica: PCR - Reação em Cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction.

Condições de armazenamento e transporte

- O **Hot Start Master mix 4B** para PCR pode ser transportada a **4°C ±2°C**. Manter ao abrigo da luz e umidade.

- **A temperatura de armazenamento deve ser de -20°C.**

Medida de segurança

Atenção! recomenda-se ao manusear este produto utilizar os EPI's de acordo com o nível de biossegurança exigido para a amostra a ser manipulada. Recomendações básicas: jaleco, luvas de procedimento, máscara N95 ou cirúrgicas, óculos de proteção e avental de mangas longas.

Para obtenção de informações referentes à biossegurança e ações em casos de acidentes com o produto, consultar a FISPQ (Ficha de Segurança de Produto Químico) disponíveis no SAC (Serviço de Assistência ao Cliente) da Phoneutria Biotecnologia e Serviços através do e-mail **pht@phoneutria.com.br**, telefone **+55 31 99585-3050** ou **+55 31 3427-6413**. Ou pelo site **www.phoneutria.com.br**

Protocolo - PCR

Use luvas, máscara, avental e touca durante todo processo. Sempre use microtubos e ponteiros novas. Certifique-se que a bancada esteja limpa antes de iniciar sua PCR.

1. Retire do freezer os reagentes: Master mix 4B; Água Ultra Pura livre de DNase (não fornecida); Primers (não fornecidos); DNA molde (não fornecido). Após descongelar, homogeneizar os reagentes no vórtex e em seguida centrifugue rapidamente (spin) para concentrar todo volume no fundo do tubo. **Não centrifugar o Hot Start Master mix 4B pós homogeneizado. (utilizar o Master mix 4B apenas com o seu precipitado homogeneizado e resuspendido).**

OBS: Mantenha todos reagentes no gelo.

2. Prepare uma reação como indicado abaixo. Nesse exemplo, utilizamos o volume final de 25 µl. Outros volumes podem ser utilizados, faça alterações mantendo concentração final do Hot Start Master mix 4B em **1X**.

| Reagente | Volume |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Master mix 4B 2X | 12,5 µl |
| Primer Forward (primer senso) | 1-2 µl (use de 3 a 10 pmol) |
| Primer reverse (primer anti-senso) | 1-2 µl (use de 3 a 10 pmol) |
| DNA ou cDNA molde purificado | 1 - 10 µl |
| Água ultrapura livre de DNase | Completar o volume para 25 µL |
| Volume Final 25 µl | |

*Sugestão: Utilize um ou mais controles negativos sem adição do DNA molde.

3. Utilize o programa de ciclagem com as temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão bem como o número de ciclos padronizados para sua reação.

Exemplo de ciclagem para PCR.

A ciclagem pode ser adaptada para sua reação, entretanto recomendamos manter a temperatura de extensão a 72°C.

| Temperatura | Tempo | Observação |
|-------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 95 °C | 3 min | O primeiro passo de desnaturação deve ter um tempo e temperatura maior para garantir a abertura das fitas de DNA. |
| 92 °C | 45 s | Segundo passo de desnaturação. |
| 50-60 °C | 30 s | Repetir Anelamento dos primers no DNA alvo. |
| 72 °C | 30 s | 30-35x Extensão com ação da Taq DNA pol. |
| 72 °C | 5 min | Tempo extra de extensão para finalizar a formação completa dos amplicons. |
| 4- 15 °C | infinito | Para aguardar a retirada da reação do termociclador. |

ATENÇÃO: Se for necessário, ajuste a temperatura de anelamento devido às características específicas dos primers. Os tempos indicados e número de ciclos também podem ser alterados. Faça os testes e encontre a melhor ciclagem para sua PCR.

ATENÇÃO: Amostras não preservadas e/ou armazenadas de forma inadequada podem conter DNA biológico degradado podendo prejudicar sua análise. Além do mais, amostras com alto grau de contaminantes e que não foram previamente purificadas adequadamente podem comprometer a qualidade do resultado.

ATENÇÃO: INFLUÊNCIAS Pré-analíticas (Químicas, Físicas e Biológicas): Aquecimento excessivo ou descongelamentos constantes podem afetar a qualidade dos reagentes. Evite descongelamentos fazendo alíquotas do seu reagente.

ATENÇÃO: Evite contaminação. Não manipule o produto de PCR (amplicon) na mesma área onde sua PCR é montada ou seu DNA alvo é purificado.

Dúvidas? Ligue ou mande uma mensagem para o nosso setor técnico.

Email: pht@phoneutria.com.br

(31) 99585-3050

Visite o nosso site:

