

Kit T-Plus Hot Start ADN polimerasa 100U *Highway* (K1003)

PROTOCOLO

Componente	Volumen (μL)	Concentración
Buffer reacción 10 x	5	1x
MgCl ₂ 25mM	3	1.5 mM
5 mM dNTP-mix Highway	2	200 μM
Forward-Primer	variable	0.2 – 1 μM
Reverse-Primer	variable	0.2 – 1 μM
ADN Templado	variable	< 1 μg
T-Plus Hot Start ADN pol. Highway (5 U/ μL)	0.2 – 0.5	1 – 2.5 U
Agua calidad tipo I Highway	c.s.p. 50	
Volumen total	50	

El enhancer se emplea en caso de presentar templados con alto % GC. Concentración final recomendada en el cocktail entre 0,5-2 X.

TERMOCICLADO

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Activación Inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	23 – 35
Annealing	53*	45 seg	23 – 35
Extensión	72	30 seg/kb	23 – 35
Extensión Final	72	30 seg/kb	1

*: Aproximadamente 5 $^{\circ}\text{C}$ debajo de la T_m de los primers

ACLARACIÓN:

Las condiciones de reacción (temperaturas de incubación y tiempos, concentraciones del templado, primers, enzima y MgCl₂) dependen del templado y los primers empleados. La concentración óptima de MgCl₂ varía entre 1-4 mM y debe ser determinada empíricamente.