

Kit T-Holmes ADN polimerasa 500U *Highway* (K1002)

PROTOCOLO

Componente	Volumen (µL)	Concentración
Buffer reacción TAS 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-Holmes 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	

IMPORTANTE:

Esta enzima se encuentra libre de ADN bacteriano de la cepa recombinante. El kit T-Holmes (K1002) incluye además un enhancer 5X para PCR y se emplea en caso de presentar secuencias con alto % GC o estructura secundaria compleja. Concentración final recomendada en el cocktail entre 0,5-2 X.

TERMOCICLADO

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Activación Inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	15-30 seg	25 – 35
Annealing	45-68*	15-60 seg	25 – 35
Extensión	72	1 min/kb	25 – 35
Extensión Final	72	4 min	1

*: Aproximadamente 5°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.