

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

### PROTOCOLO

| Componente                         | Volumen (µL) | Concentración |
|------------------------------------|--------------|---------------|
| Buffer reacción TAS 10 x           | 5            | 1x            |
| MgCl <sub>2</sub> 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    |               |
| <b>Volumen total</b>               | <b>50</b>    |               |

### 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<sub>m</sub> de los primers

### ACLARACIÓN:

Las condiciones de reacción (temperaturas de incubación y tiempos, concentraciones del templado, primers, enzima y MgCl<sub>2</sub>) dependen del templado y los primers empleados.