

Kit para calibração de PCR pht

Itens fornecidos:

Tampões (10x concentrado)	Composição (10x concentrado)
I0	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100
IB	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 15 mM MgCl ₂
IC	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 20 mM MgCl ₂
ID	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 30 mM MgCl ₂
IIC	400 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 20 mM MgCl ₂
IIIB	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 100 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 15 mM MgCl ₂
Tampões (5x concentrado)	
IVB	Tampão especial para PCR
Outras soluções fornecidas:	
Solução de MgCl ₂	50mM
Solução de KCl	2M
Enzima:	
Taq DNA polimerase	5 U/ul

Observações importantes (**LEIA COM ATENÇÃO**):

1. Estude a apostila antes de iniciar seus testes, ela será um guia para seus experimentos e norteará suas ações.
2. Geralmente observa-se diferença na qualidade da PCR para amostras clínicas x DNA purificado e para amostras de diferentes regiões genômicas x DNA plasmidial. Leve sempre em consideração qual a região que você pretende amplificar e qual o tipo de amostra em questão!
3. Inicie a calibração com pelo menos 2 ou 3 amostras para a qual a PCR se destina.
4. Nunca reduza ou aumente demais o volume final da sua reação. Este deve estar entre 20-50ul.
5. Tenha certeza de que a água, o dNTP e os primers utilizados estão em perfeito estado com uma reação já padronizada.
6. Varie sempre uma coisa de cada vez, e repita sempre como controle um resultado anterior para fins de comparação.
7. Após obter cada resultado, retorne sempre ao fluxograma, que indicará os próximos passos a serem seguidos.

PRINCIPAIS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA QUALIDADE DE SUA REAÇÃO:

1) Quantidade final de DNA molde

A falta de DNA molde compromete a produção do amplicon em quantidade detectável pelo sistema de visualização (gel de agarose, poliacrilamida, capilar, etc.) e o excesso pode gerar um grande número de produtos inespecíficos. Outro problema está ligado a presença de agentes inibitórios que podem comprometer a reação. Se possível faça uma quantificação do DNA molde, preferencialmente por meio de gel (DNA pouco purificado) ou espectrofotometro (DNA bem purificado).

2) Tipo de tampão

Dois fatores importantes devem ser considerados. Primeiro se o tampão já contém ou não magnésio e qual sua concentração (veja lista de tampões - pH disponíveis). Segundo, qual o tipo de sal que faz parte da composição do tampão (normalmente KCl, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). O tampão mais utilizado com sucesso possui KCl na sua composição.

O cátion presente no sal se liga à carga negativa do DNA, reduzindo a repulsão entre as duas fitas e mantendo-as mais unidas. Porém, sais diferentes podem interagir de forma diferente com as fitas de DNA, gerando resultados diferentes, dependendo exclusivamente de sua reação.

3) Concentração final de MgCl_2

A concentração final de cloreto de magnésio funcional para maioria das reações varia entre 1,5 mM e 2,0 mM. Entretanto outras concentrações devem ser avaliadas. Concentrações abaixo de 1,5 mM são em geral pouco funcionais, concentrações acima de 2,0 mM podem gerar resultados satisfatórios mas normalmente existe um incremento na amplificação de bandas inespecíficas. O cloreto de magnésio se liga ao sítio catalítico da enzima, regulando sua atividade.

4) Programa de amplificação

- Temperatura de anelamento: Normalmente é baseada no TM (Temperatura média de anelamento) do iniciador. Entretanto, a TM varia com a concentração de sais do tampão utilizado e com a concentração do próprio primer. Uma solução prática é trabalhar com temperaturas ligeiramente acima e abaixo do TM calculado para o iniciador. No caso do TM de um iniciador ser abaixo do TM do outro iniciador, utilize como referencia a temperatura mais baixa. Exemplo:
 - Primer 1: TM = 52°C; Primer 2: TM = 55°C
 - Temperaturas de anelamentos:
 - 48°C; 50°C; 52°C (referência inicial); 54°C; 56°C, 58°C

Obs: Alguns termocicladores possuem sistemas gradientes para temperatura.

- Número de ciclos: Para uma reação bem calibrada e com DNA molde de boa qualidade 25 ciclos são suficientes para se obter um produto de PCR visível em gel. Entretanto sugerimos que no processo de calibração sejam utilizados entre 30 e 35 ciclos. Um número maior de ciclos pode gerar amplicons diversos que são algumas vezes confundidos com o produto final esperado da PCR.
- Tempo de desnaturação das fitas: No caso de ocorrerem bandas inespecíficas persistentes, tente reduzir um pouco o tempo de abertura das fitas. O tempo de desnaturação geralmente utilizado é de 30 segundos, teste com 15 e 20 segundos.

5) Unidades de Taq DNA polimerase

A falta ou o excesso de enzima pode comprometer a qualidade da reação. A falta pode amplificar fracamente o DNA alvo, gerando bandas de difícil visualização. Por outro lado o excesso facilita a amplificação de produtos inespecíficos que acabam utilizando grandes quantidades de primers e enzimas dificultando assim a amplificação da região específica.

6) Quantidade ou concentração final de iniciadores (primers)

A quantidade de iniciadores para uma reação varia entre 1 a 20 picomoles de cada iniciador para reações com volumes finais entre 10 e 50 μl (microlitros).

7) Concentração final de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Concentração final entre 0,1 e 0,2 mM de cada nucleotídeo tem mostrado grande eficiência para maioria das reações.

FLUXOGRAMA DE AÇÃO



- Testes:**
- 1) Variar a quantidade de DNA (teste 01)
 - 2) Variar o tipo de tampão utilizado. (Atenção: caso necessite utilizar o tampão I0, varie a concentração de magnésio) (teste 02)
 - 3) Variar a temperatura de anelamento (teste 03)
 - 4) Aumentar o número de ciclos de amplificação (teste 06)

- Testes:**
- 1) Variar a quantidade de DNA (teste 01)
 - 2) Variar a temperatura de anelamento (teste 03)
 - 3) Variar o tipo de tampão utilizado. (Atenção: caso necessite utilizar o tampão I0, varie a concentração de magnésio) (teste 02)
 - 4) Testar o tampão especial IVB em diferentes concentrações: (1,25x; 1x; 0,875x; 0,75x; 0,625x; 0,5x) (teste 04)
 - 5) Testar o tampão IVB acrescido de KCl em diferentes concentrações: (10; 20; 30; 40; 50 mM) (teste 05)

- Testes:**
- 1) Variar a quantidade de DNA (teste 01)
 - 2) Variar a temperatura de anelamento (teste 03)
 - 3) Variar o tipo de tampão utilizado. (Atenção: caso necessite utilizar o tampão I0, varie a concentração de magnésio) (teste 02)
 - 4) Testar o tampão especial IVB em diferentes concentrações: (1,25x; 1x; 0,875x; 0,75x; 0,625x; 0,5x) (teste 04)
 - 5) Aumentar o número de ciclos de amplificação (teste 06)

★ Caso você não consiga sair desse passo, pode ser que você esteja com algum dos seguintes problemas:

- 1) Não tenha DNA suficiente na amostra, ou o mesmo esteja degradado,
- 2) A mesma esteja contaminada com inibidores de reação,
- 3) Algum dos reagentes (primer/dNTP) podem estar com problemas,
- 4) A orientação dos primers pode não estar de acordo, confira no Blast.

TESTE INICIAL:

Sugerimos iniciar a calibração com um tampão convencional (ex: IB), com uma temperatura de anelamento mediana (cerca de 58°C – ou de acordo com o Tm do primer) e aproximadamente 30 ciclos.

(sugestão: 58°C para anelamento e 30 ciclos de amplificação)

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão IB	10x	1x	2,5 ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	*quantificar*	Aprox. 100 ng de DNA genômico ou 10 ng de DNA plasmidial		
	Volume final		25ul	

Após verificar o resultado deve-se ponderar sobre ele, de acordo com o fluxograma da página 02. Foi obtido alguma banda? A banda está nítida? A banda é única? É do tamanho esperado? Use essa reação como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

TESTE 01:**REAÇÃO COM VARIAÇÃO NA QUANTIDADE DE DNA:**

Antes de iniciar esta reação será necessário fazer uma diluição seriada do seu DNA para as concentrações indicadas no quadro abaixo.

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão IB	10x	1x	2,5 ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	Variar a quantidade: 10 x à mais volume inicial 10, 100, 1.000 e 10.000 x à menos			
	Volume final		25ul	

Após verificar o resultado deve-se escolher a melhor condição e usa-la como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

TESTE 02:**REAÇÃO COM VARIAÇÃO DO TAMPÃO UTILIZADO:**

ATENÇÃO: Utilizar um tampão para cada reação!

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado
Água			q.s.p. 25 ul
Tampão IB	10x	1x	2,5 ul
Tampão IC	10x	1x	2,5 ul
Tampão ID	10x	1x	2,5 ul
Tampão IIC	10x	1x	2,5 ul
Tampão IIB	10x	1x	2,5 ul
Tampão IVB	5x	1x	5 ul
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul
	Volume final		25ul

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO PARA O TAMPÃO IO:

ATENÇÃO: Utilizar uma concentração para cada reação!

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado
Água			q.s.p. 25 ul
Tampão IO	10x	1x	2,5 ul
Cloreto de Magnésio	50 mM	0,75 mM	0,375 ul
		1,5 mM	0,75 ul
		2,0 mM	1 ul
		3,0 mM	1,5 ul
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul
	Volume final		25ul

Após verificar o resultado deve-se escolher a melhor condição e usa-la como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

TESTE 03:**VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DE ANELAMENTO DO PRIMER:**

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão escolhido	____x	1x	____ ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul	
	Volume final		25ul	

ATENÇÃO: Recomenda-se utilizar preferencialmente um termociclador que tenha a opção de gradiente de temperatura, pois em apenas uma reação pode-se testar diversas opções. Use o bom senso: em caso de existirem bandas inespecíficas, privilegie o aumento de temperatura, em caso de não existirem bandas ou estas estarem fracas, privilegie a diminuição. Varie de 2 em 2°C ou de 1 em 1°C, num espectro de até 10°C para mais ou para menos.

Após verificar o resultado deve-se escolher a melhor condição e usa-la como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

TESTE 04:**VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE TAMPÃO ESPECIAL IVB UTILIZADA:**

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão IVB	5x	1,25x 1x 0,875x 0,75x 0,625x 0,5x	6,25 ul 5 ul 4,375 ul 3,75 ul 3,125 ul 2,5 ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul	
	Volume final		25ul	

ATENÇÃO: Utilizar uma concentração para cada reação!

Após verificar o resultado deve-se escolher a melhor condição e usa-la como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

ATENÇÃO: Utilizar uma concentração para cada reação!

**TESTE 05:
VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KCl UTILIZADO EM ASSOCIAÇÃO AO TAMPÃO ESPECIAL IVB**

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão IVB	5x	_____ x	_____ ul	
KCl	2M	0 mM	0 ul	
		10 mM	0,125 ul	
		20 mM	0,25 ul	
		30 mM	0,375 ul	
		40 mM	0,5 ul	
		50 mM	0,625 ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul	
	Volume final		25ul	

Após verificar o resultado deve-se escolher a melhor condição e usa-la como controle para o próximo teste.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

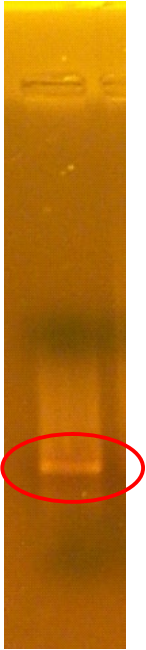
**TESTE 06
AUMENTO NO NÚMERO DE CICLOS DA REAÇÃO:**

	Concentração inicial	Concentração final	Volume utilizado	
Água			q.s.p. 25 ul	
Tampão escolhido	_____x	1x	_____ ul	
dNTP	1 mM	0,1 mM	2,5 ul	
Primer forward	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Primer reverse	20 pmol	0,4 pmol	0,5 ul	
Taq	5 U/ul	(1 U / reação)	0,2 ul	
DNA	_____ ng/ul	_____ ng	_____ ul	
	Volume final		25ul	

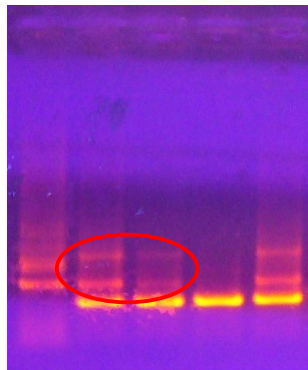
Pode-se aumentar para 35 ciclos. Caso o resultado ainda não seja satisfatório, aumentar para 40 ciclos ou até para 45 ciclos. Depois dessa quantidade a enzima perde parte de sua atividade. Recomenda-se não aumentar de uma vez para 45 ciclos, mas testar primeiro 35 e 40 ciclos.

RETORNE AO FLUXOGRAMA PARA DEFINIR SUA PRÓXIMA AÇÃO

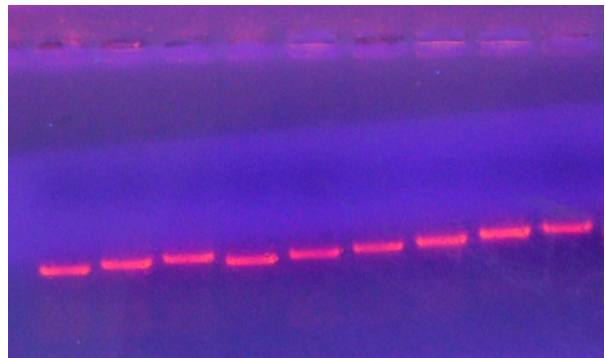
Exemplo de banda sem nitidez:



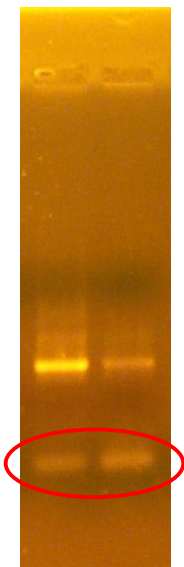
Exemplo de bandas múltiplas e com rastro



Exemplos de bandas únicas, nítidas e satisfatórias



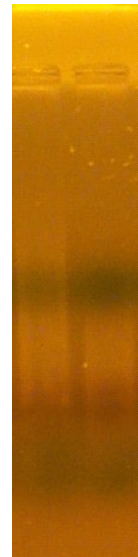
Exemplo de banda com resto de primer



Exemplo de banda com excesso de DNA molde plasmidial



Exemplo de ausência de banda



Recorte e use em seu caderno de bancada!

	Volume utilizado			
Água				
Tampão escolhido				
dNTP	2,5 ul			
Primer forward	0,5 ul			
Primer reverse	0,5 ul			
Taq	0,2 ul			
DNA				
	Volume final			

	Volume utilizado			
Água				
Tampão escolhido				
dNTP	2,5 ul			
Primer forward	0,5 ul			
Primer reverse	0,5 ul			
Taq	0,2 ul			
DNA				
	Volume final			

	Volume utilizado			
Água				
Tampão escolhido				
dNTP	2,5 ul			
Primer forward	0,5 ul			
Primer reverse	0,5 ul			
Taq	0,2 ul			
DNA				
	Volume final			

	Volume utilizado			
Água				
Tampão escolhido				
dNTP	2,5 ul			
Primer forward	0,5 ul			
Primer reverse	0,5 ul			
Taq	0,2 ul			
DNA				
	Volume final			

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.