

GARANTÍA

BIOTOOLS garantiza la conformidad de los productos con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser devuelto a BIOTOOLS (portes pagados) o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición. Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados y para uso exclusivo en investigación. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A., han sido evaluados y certificados en cuanto a cumplimiento de los requisitos de la ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – Spain

© 2009 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados



BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
E-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu



BIOTOOLS
BIOTOOLS B & M LABS. S.A.

CERTAMP COMPLEX

Ref.	FORMATO	CONTENIDO
10.342	250 rxns	CERTAMP Complex
10.343	500 rxns	CERTAMP Complex

Almacenar a -20°C

Aviso a usuarios: Algunas de las aplicaciones que pueden llevarse a cabo con este producto están cubiertas por patentes aplicables en ciertos países. La adquisición de este producto no incluye o provee de una licencia para realizar aplicaciones patentadas. En algunos casos, los usuarios tienen la obligación de adquirir una licencia, dependiendo del país y/o la aplicación.

Ed 23 – Febrero 2016

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

CERTAMP COMPLEX está especialmente diseñado para la optimización y mejora de reacciones de amplificación a partir de moldes de ADN complejos y/o escasos. Una combinación exclusiva de ADN polimerasas (*proof-reading* y *no proof-reading*), junto con cofactores y buffer especiales, aumentan la eficacia y el rendimiento de reacciones de PCR complejas.

USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

ADN genómico, moldes ricos en GC o con estructura secundaria son difíciles de amplificar por técnicas de PCR estándar. La razón principal de esta dificultad es que las polimerasas convencionales, que carecen de actividad *proof-reading*, suelen introducir errores durante la replicación del ADN molde. La acumulación de errores en la secuencia amplificada puede provocar una detención de la copia originando productos truncados; o bien acumulación de errores en la secuencia amplificada comprometiendo el rendimiento y la fidelidad de la PCR.

Certamp Complex solventa las deficiencias de las polimerasas incorporando una mezcla de enzimas (*Certamp Complex Enzyme Mix*) que garantiza la máxima procesividad, manteniendo una tasa de error muy baja. La ADN polimerasa con actividad 3'→5' exonucleasa, presente en la mezcla, elimina las bases erróneas introducidas por la polimerasa estándar (sin actividad *proof-reading*) y permite que ésta pueda continuar copiando el ADN molde. La *Certamp Complex Enzyme Mix* resulta idónea para la amplificación de virtualmente cualquier molde con independencia de su complejidad o tamaño.

La eficiente mezcla enzimática también reduce considerablemente las amplificaciones inespecíficas, incrementa el rendimiento de reacción y facilita la optimización de experimentos de PCR a partir de moldes escasos (a partir de 0,5 pg) y/o complejos. Además, el *10X Certamp Complex Buffer MgCl₂ FREE*, proporcionado con la enzima, ha sido optimizado a fin de contribuir al alto rendimiento y fidelidad de copia de este kit.

Aplicaciones del *Certamp Complex*:

- Amplificación de moldes de ADN ricos en GC
- Amplificación de moldes de ADN con estructuras secundarias
- Amplificaciones a partir de baja concentración de molde (límite de detección 0.5 pg)
- Amplificación de fragmentos hasta 8 Kb
- Clonaje: los productos obtenidos pueden ser utilizados tanto en T/A cloning como en clonaje con extremos romos.

2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Conservar los reactivos a -20°C en un congelador que garantice una temperatura constante (no se recomiendan congeladores *frost-free*). El tampón de almacenamiento de la mezcla enzimática contiene glicerol al 50 % (v/v), lo que evita que las enzimas se congelen a -20°C. En cualquier caso, si las enzimas se congelan, su actividad no se verá afectada.

3. COMPONENTES

Certamp Complex Enzyme Mix (1 U/μl)-Mezcla de ADN polimerasas *proof-reading* y *no proof-reading*.

10X Certamp Complex Buffer MgCl₂ FREE- Este buffer ha sido formulado para permitir un rendimiento y fidelidad óptimos en reacciones de amplificación de moldes de ADN complejos y/o escasos. El buffer contiene aditivos y estabilizantes que permiten optimizar fácilmente reacciones de amplificación complejas.

10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE- Tris HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM. Buffer alternativo para reacciones de amplificación convencionales.

50 mM MgCl₂ Solution-Los buffers de reacción suministrados con el kit no contienen iones Mg²⁺ en su composición, el usuario deberá optimizar la concentración para cada reacción.

4. PROTOCOLOS DE USO

Las condiciones óptimas deben de ser determinadas para cada experimento. Biotools recomienda dos protocolos de uso para el CERTAMP Complex, conforme a las particularidades del molde a amplificar.

I. Alternativa 1 – 10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE

Este protocolo está recomendado para reacciones de amplificación convencionales.

- 1.- Calcule el número de viales de reacción (0.2 ml o 0.5 ml) a utilizar. Se recomienda incluir un control positivo y un control negativo en cada set de reacciones.
- 2.- Descongele y conserve en hielo los reactivos durante su manipulación. Los viales de reacción también deben mantenerse en hielo hasta su introducción en el termociclador. Preparar la Master Mix contemplando un número de reacciones en exceso.

Preparación de la Master Mix 1

Reactivo	Volumen para 25 μl de rxn*
CERTAMP COMPLEX ENZYME MIX	1 μl
10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE	2.5 μl
50 mM MgCl ₂ Solution	1 μl
dNTPs 10 mM each (Ref. 20.031)	0.5 μl
Primers	10-20 pmoles de cada primer
Agua bidestilada estéril	Hasta completar 25 μl

* Las cantidades indicadas están calculadas para un volumen final de reacción de 25 μl.

- 3.- Dispensar las alícuotas de la Master Mix en los viales de reacción y añadir el ADN.
- 4.- Introducir los viales de reacción en el termociclador y llevar a cabo la amplificación.

II. Alternativa 2 – 10X Certamp Complex Buffer MgCl₂ FREE

Este protocolo está recomendado **para amplificaciones de moldes complejos**.

- Calcule el número de viales de reacción (0.2 ml o 0.5 ml) a utilizar. Se recomienda incluir un control positivo y un control negativo en cada set de reacciones.
- Descongele y conserve **en hielo** los reactivos del kit durante su manipulación. Los viales de reacción también deben mantenerse en hielo hasta su introducción en el termociclador. Preparar la Master Mix contemplando un número de reacciones en exceso.

Preparación de la Master Mix 2

Reactivos	Volumen para 25 µl de rxn*
CERTAMP COMPLEX ENZYME MIX	1 µl
10X Certamp Complex Buffer MgCl ₂ FREE	2.5 µl
50 mM MgCl ₂ Solution	1 µl
dNTPs 10 mM each (Ref. 20.031)	0.5 µl
Primers	10-20 pmoles de cada primer
Agua bidestilada estéril	Hasta completar 25 µl

* Las cantidades indicadas están calculadas para un volumen final de reacción de 25 µl.

- Dispensar las alícuotas de la Master Mix en los viales de reacción y añadir el ADN (0.5 pg-500 ng/reacción).
- Introducir los viales de reacción en el termociclador y llevar a cabo la amplificación.

III. Amplificación de ADN molde complejo (ADN humano)

CERTAMP Complex está indicado para la amplificación de moldes de ADN complejos (ej. ADN humano).

- Calcule el número de viales de reacción (0.2 ml ó 0.5 ml) a utilizar. Se recomienda incluir un control positivo y un control negativo en cada set de reacciones.
- Descongele y conserve **en hielo** los reactivos del kit durante su manipulación. Los viales de reacción también deben mantenerse en hielo hasta su introducción en el termociclador. Preparar la Master Mix contemplando un número de reacciones en exceso.

Preparación de la Master Mix

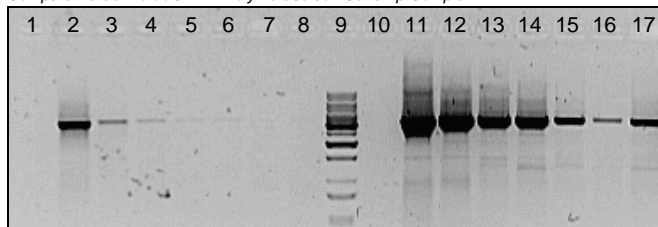
Reactivo	Volumen (por reacción)
CERTAMP COMPLEX ENZYME MIX	1 µl
10X Certamp Complex Buffer MgCl ₂ FREE	2.5 µl
50 mM MgCl ₂ Solution	1 µl
dNTPs 10 mM each (Ref. 20.031)	0.5 µl
Primers específicos para HBV	0.5 µl (20 µM de cada primer)
Agua bidestilada estéril	Hasta completar 25 µl

- Dispensar las alícuotas de la Master Mix en los viales de reacción y añadir el ADN molde (0.5 pg-50 ng).
- Llevar a cabo la amplificación según el siguiente programa:

PASOS	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	1	94°C	3 min
Desnaturalización Anillamiento	35	94°C	30 seg
Extensión		55°C	1 min
Extensión Final	1	72°C	3 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

- Analizar los productos de amplificación obtenidos en agarosa 1-1.5 % en TAE o TBE. El tamaño esperado es 3 Kb.

Amplificación de diferentes cantidades de ADN humano-
Comparativa de Biotools DNA Polymerase con Certamp Complex



Carriles 1, 10: Controles negativos (sin ADN)
Carriles 2, 11: 100 pg de ADN molde
Carriles 3, 12: 15 pg de ADN molde
Carriles 4, 13: 7.5 pg de ADN molde
Carriles 5, 14: 3.75 pg de ADN molde
Carriles 6, 15: 1.875 pg de ADN molde
Carriles 7, 16: 0.937 pg de ADN molde
Carriles 8, 17: 0.47 pg de ADN molde
Carril 9: 1 Kb Ladder marker (Ref. 31.005)

5. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa	Recomendación
Baja eficiencia de amplificación o ausencia de amplificación	Error de pipeteo, ausencia o mal estado de algún reactivo	Verifique la concentración y condición de almacenamiento de dNTPs, primers, etc. Repita el ensayo asegurándose de que no falta ningún reactivo y no hay errores de concentración o pipeteo.
	Problemas con el ADN molde	Verifique la concentración y calidad del material de partida. No utilice ADN degradado. Si el ADN molde presenta cierta complejidad, por ej. alto contenido en secuencias GC se recomienda añadir DMSO a la reacción. Repita la reacción de PCR con una dilución del material de partida o con otra alícuota del ADN molde.
	Problemas con los primers	Revise el diseño de los primers y las condiciones de conservación. Evite aquellos diseños proclives a la formación de dímeros. Repita la PCR con diferente concentración de primers (0.1-0.5 µM) en incrementos de 0.1 µM. Verifique que los primers no se encuentren degradados, mediante un gel de poliacrilamida.
	Concentración de MgCl ₂ no óptima	Repita la PCR con diferente concentración de Mg ²⁺ (1.5-4 mM) en incrementos de 0.25 mM.
	Baja concentración de enzimas	Aumente la concentración de la mezcla enzimática en incrementos de 0.2 Unidades
Programación no óptima		Verifique los siguientes parámetros del programa de amplificación: Desnaturalización - aumente la temperatura y el tiempo de la desnaturalización inicial. Anillamiento - optimice la temperatura y el tiempo de anillamiento. Para aumentar la especificidad utilice el programa <i>touchdown or stepdown</i> . Tiempo de extensión - en caso de que el periodo de extensión sea demasiado corto aumentelo en incrementos de 30 seg. Número de ciclos - incremente el número de ciclos en incrementos de 5 ciclos. Incluya el periodo de elongación final en el programa de amplificación.
	Temperatura de anillamiento baja	Aumente la temperatura de anillamiento en incrementos de 1°C.
	Problemas con los primers	Revise el diseño de los primers así como su condición de conservación. Normalmente la concentración de los primers es equimolar. Revise la concentración de ambos primers y en caso necesario titúelos. Repita la PCR con una concentración diferente de primers (0.1-0.5 µM) en incrementos de 0.1 µM. Verifique que los primers no se encuentren degradados, mediante un gel de poliacrilamida.
Bandas de amplificación inespecíficas o smear	Exceso de ADN molde	Utilice diluciones del ADN molde.
	Contaminación	Prepare siempre un control negativo (NTC <i>no template control</i>) Si en el control negativo aparecen bandas o smear cambie de reactivos.
	Concentración de enzimas elevada	Optimice la concentración de la mezcla enzimática para su ensayo.
	Programa de amplificación no adecuado	Utilice el programa <i>touchdown or stepdown</i> del termociclador. Reduzca el número de ciclos.
	Concentración de MgCl ₂ no óptima	Repita la PCR con diferente concentración de Mg ²⁺ (1.5-4 mM) en incrementos de 0.25 mM.
Amplificación en el control negativo	Contaminación	Repita la PCR utilizando un nuevo lote de reactivos

6. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Tamaño	Referencia
Certamp Complex Enzyme Mix (1U/µL)	280 µL	10.342
	550 µL	10.343
10X Certamp Complex Buffer MgCl₂ FREE	1.4 mL	10.342
	1.4 mL	10.343
10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE	1.8 ml	10.342
	1.8 ml	10.343
50 mM MgCl₂ Solution	1.8 ml	10.342
	1.8 ml	10.343

BIOTOOLS
BIOTOOLS B&M LABS. S.A.