

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 retornado 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
BIOTOOLS B & M LABS. S.A.

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 LONG

Ref.	FORMATO	CONTENIDO
10.332	250 rxns	CERTAMP Long
10.333	500 rxns	CERTAMP Long

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 25 – Febrero 2016

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

CERTAMP Long está especialmente diseñado para la optimización y mejora de reacciones de amplificación de fragmentos de ADN largos (superiores a 5 Kb). La combinación exclusiva de enzimas (*proof-reading* y *no proof-reading*), cofactores y buffer especiales, permite conseguir alta fidelidad y excelente rendimiento en estas amplificaciones.

USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

La utilización de ADN polimerasas no *proof-reading* pero con alta procesividad o tasa de síntesis puede introducir errores en la secuencia amplificada. En amplificaciones mayores de 3 Kb, la acumulación de mutaciones puede derivar en consecuencias importantes comprometiendo la fidelidad y el rendimiento del producto final.

La utilización de ADN polimerasas con actividad correctora de errores, en cambio, proporciona una menor tasa de error (un orden de magnitud inferior que las polimerasas convencionales), presenta menor procesividad y requieren mayor tiempo de extensión. La mezcla de polimerasas con actividad *proof-reading* y no *proof-reading* presente en el CERTAMP Long (Certamp Long Enzyme Mix), garantiza la máxima procesividad, manteniendo una tasa de error muy baja.

Aplicaciones del Certamp Long:

- Amplificación de fragmentos de ADN hasta 40 Kb
- Amplificación de ADN genómico eucariota hasta 15 Kb
- Clonaje: los productos obtenidos pueden ser utilizados tanto en T/A cloning como en clonaje con extremos romos.

2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Conservar 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. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL KIT

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

10X Certamp Long Buffer MgCl₂ FREE- Este buffer ha sido formulado para permitir un rendimiento y fidelidad óptimos en amplificaciones de fragmentos largos. El buffer contiene aditivos y estabilizantes que permiten optimizar fácilmente estas reacciones.

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 (fragmentos < 5 Kb).

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. Biotoools recomienda dos protocolos de uso para el CERTAMP Long, conforme a la longitud del molde a amplificar.

I. Alternativa 1 – 10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE

Este protocolo está recomendado **para amplificaciones de fragmentos ≤ 5 Kb**.

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 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 1

Reactivo	Volumen para 25 μl de rxn*
CERTAMP LONG 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 (1 pg a 500 ng).

4.- Introducir los viales de reacción en el termociclador y llevar a cabo la amplificación.

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

Este protocolo está recomendado **para amplificaciones de fragmentos > 5 Kb**.

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 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 LONG ENZYME MIX	1 μl
10X Certamp Long 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. Añadir el ADN (1 pg-500 ng.).

4.- Introducir los viales de reacción en el termociclador y llevar a cabo la amplificación.

III. Amplificación de ADN de Lambda

Este protocolo está indicado para la amplificación de fragmentos del fago Lambda hasta 20 Kb utilizando CERTAMP Long. Si bien este programa suele resultar óptimo para la amplificación de moldes > 5 Kb, el usuario deberá adaptar el protocolo a su PCR específica.

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 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

Reactivos	Volumen para 25 µl de rxn*
CERTAMP LONG ENZYME MIX	1 µl
10X Certamp Long Buffer MgCl ₂ FREE	2.50 µl
50 mM MgCl ₂ Solution	1.75 µl
dNTPs 10 mM each (Ref. 20.031)	0.94 µl
Primers específicos	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 13 µl de la Master Mix en los viales de reacción y añadir el ADN molde (10 ng).

4.- Introducir los viales de reacción en el termociclador y llevar a cabo el programa de amplificación detallado a continuación (véase Nota 1).

Programa de amplificación:

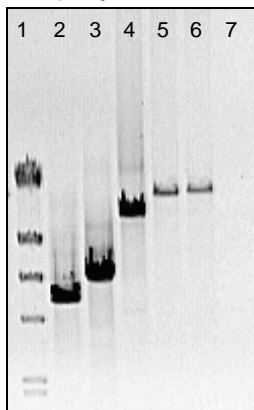
Paso	Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96°C	5 min
Desnaturalización	10	96°C	1 min
Anillamiento		58°C	30 seg
Extensión		72°C	1 min + 1 seg/ciclo
Desnaturalización	20	96°C	30 seg
Anillamiento		68°C	23 min
Extensión Final	1	72°C	10 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

Nota 1: El primer bloque sirve para crear productos de amplificación incompletos que actuarán como primers en los siguientes pasos de amplificación. El segundo bloque une los pasos de annealing y extensión a 68 °C, programa óptimo para el fago λ.

Cada experimento puede requerir diferentes temperaturas en los pasos de anillamiento y extensión.

5.- Analizar los productos mediante electroforesis en agarosa 0.5 % en TAE o TBE.

Amplificación de ADN de λ utilizando Certamp Long



Carril 1: Lambda/Hind III marker (Ref. 31.011)
 Carril 2: Amplificación de Fago λ (fragmento 5 Kb)
 Carril 3: Amplificación de Fago λ (fragmento 7 Kb)
 Carril 4: Amplificación de Fago λ (fragmento 13 Kb)
 Carril 5: Amplificación de Fago λ (fragmento 19 Kb)
 Carril 6: Amplificación de Fago λ (fragmento 20 Kb)
 Carril 7: Control negativo (sin ADN molde) utilizando primers para amplificación de 20 Kb

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 de 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 de (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</i> or <i>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.
Bandas de amplificación inespecíficas o smear	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.
	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</i> or <i>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 Long Enzyme Mix (1U/µL)	280 µL	10.332
	550 µL	10.333
10X Certamp Long Buffer MgCl₂ FREE	1.4 mL	10.332
	1.4 mL	10.333
10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE	1.8 ml	10.332
	1.8 ml	10.333
50 mM MgCl₂ Solution	1.8 ml	10.332
	1.8 ml	10.333

BIOTOOLS
 BIOTOOLS B & M LABS. S.A.