

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 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.

DNA AmpliGel PLUS Master Mix

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.551	12 x 8-tube strips	DNA AmpliGel PLUS Master Mix-Strips

Almacenar a 4°C

Uso exclusivo en investigación. No para uso en procedimientos diagnósticos

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. 03 – Febrero 2016

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

La nueva **DNA AmpliGel PLUS Master Mix** desarrollada es una *master mix* premezclada y pre-dispensada optimizada para conseguir la máxima eficiencia, precisión y sensibilidad en reacciones de amplificación utilizando diferentes moldes de ADN (incluyendo ADN genómicos y moldes ricos en GC). DNA AmpliGel PLUS Master Mix permite amplificar fragmentos de DNA de hasta **10 kb de largo** y representa una mejora respecto de la DNA AmpliGel Master Mix.

Con la excepción de los primers y el molde, los tubos de DNA AmpliGel PLUS Master Mix contienen todos los reactivos necesarios, a la concentración óptima, para llevar a cabo reacciones de amplificación de 25 µl.

DNA AmpliGel PLUS Master Mix se provee en tiras de 8 tubos de 0.2 ml. El formato gelificado minimiza las etapas de manipulación y reduce el riesgo de contaminación; sólo los primers y el ADN molde deben ser incorporados para realizar la PCR. Al utilizar la *master mix* gelificada el tiempo necesario para la preparación de la mezcla de reacción es prácticamente inexistente.

Los productos de la línea DNA AmpliGel Master Mixes han sido diseñados y producidos utilizando una tecnología propiedad de Biotools, la "Gelification Technology", cubierta por la patente internacional PCT/ES02/00109. Las mezclas de reacción gelificadas de Biotools representan una clara ventaja competitiva respecto a las mezclas de reacción líquidas*:

Ventajas de la tecnología de gelificación*:

- ✓ *Tiempo de operación mínimo*
- ✓ *Menos errores de manipulación*
- ✓ *Económicamente rentable (gasto despreciable en consumibles)*
- ✓ *Condiciones de envío y almacenamiento convenientes*
- ✓ *Mínima variación intra- e inter-ensayo*

La utilización de productos de la línea DNA AmpliGel Master Mixes de Biotools reduce el tiempo de operación y las etapas de pipeteo, simplificando la rutina de las reacciones de amplificación.

Aplicaciones de la DNA AmpliGel PLUS Master Mix:

- ✓ *PCR rutinarias con elevada reproducibilidad (hasta 10 kb)*
- ✓ *"Primer extension"*
- ✓ *Clonaje*
- ✓ *Secuenciación de genes*
- ✓ *RT-PCR*
- ✓ *PCR a gran escala*
- ✓ *Experimentos de campo*

Nota: El uso de esta *master mix* no es recomendable para PCRs en las que se pretenda amplificar secuencias homólogas a las de *E. coli*.

Componentes: Los viales de DNA AmpliGel PLUS Master Mix contienen Biotools DNA Polymerase; dNTPs; MgCl₂; Buffer de Reacción y estabilizantes a concentraciones idóneas para llevar a cabo una gama amplia de reacciones de amplificación de ADN.

2. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Almacenar los viales de DNA AmpliGel PLUS Master Mix a **4 °C** en una atmósfera de humedad controlada. Si los viales se manipulan y conservan siguiendo estas recomendaciones, su estabilidad será la indicada en la etiqueta correspondiente.

El envío y la manipulación se realiza a temperatura ambiente.

3. CONSIDERACIONES GENERALES

Molde: La calidad del ADN molde es clave para la obtención de resultados óptimos en las reacciones de amplificación. Si bien los métodos de extracción convencionales generan moldes de calidad suficiente para PCR, alguno de los reactivos utilizados en la purificación (fenol, EDTA, proteinasa K, detergentes iónicos, partículas de sílice, etc.), suelen comportarse como inhibidores de la amplificación. Biotools recomienda su línea de productos Speedtools para la extracción y purificación de ADN genómico a partir de sangre (*Speedtools DNA Extraction*), de tejido (*Speedtools Tissue DNA Extraction kit*), de comida (*Speedtools Food DNA Extraction kit*) y a partir de plantas (*Speedtools Plant DNA Extraction kit*).

Se recomienda transportar las muestras en frío ya que la falta de refrigeración puede degradar el ADN. En caso de manipular muestras clínicas, tratarlas como si éstas fueran potencialmente infecciosas.

La cantidad de ADN a incluir en la reacción de amplificación dependerá del origen y de la calidad del molde a utilizar. Nosotros recomendamos entre **0.1 pg-10 ng** para moldes simples como ADN plasmídico o de fago, y entre **0.1 ng-500 ng** para moldes complejos como ADN genómico. El exceso de molde incrementa la formación de productos de amplificación inespecíficos y reduce el rendimiento de la reacción; no utilizar >1 µg de ADN molde. Si no conoce la concentración de ADN, agregue un volumen de extracción fijo.

Concentración de MgCl₂: La concentración de iones magnesio afecta el anillamiento de los cebadores y la desnaturalización del molde, así como la actividad y fidelidad de la polimerasa. Concentraciones elevadas de MgCl₂ pueden resultar en la formación de productos de amplificación inespecíficos, en tanto que una concentración insuficiente puede reducir el rendimiento de la reacción. La concentración final de MgCl₂ en la mezcla de reacción, una vez reconstituido el gel en un volumen final de 25 µl, es de **2 mM** (concentración óptima para la mayoría de las reacciones de amplificación).

Diseño de primers: Los primers utilizados en la reacción de amplificación suelen tener un tamaño entre 15-30 bases de largo y un contenido en GC entre 40-60%. Por otra parte, es recomendable que la temperatura de anillamiento de ambos primers sea prácticamente idéntica.

Al realizar el diseño tener en cuenta que los primers no formen horquillas o presenten complementariedad entre ellos. En el extremo 5' de los cebadores la ausencia de homología completa con el ADN molde no es crítica como lo es la falta de complementariedad en el extremo 3'. Evitar incluir más de tres nucleótidos G ó C en el extremo 3' de los primers a fin de reducir el riesgo de anillamientos inespecíficos.

La cantidad óptima de molde y primers en la PCR deberá ser determinada experimentalmente para cada nueva combinación de molde y primer. La concentración de primers recomendada es 0.1-1.0 µM. Un exceso de primers favorece la formación de dímeros y/o productos de amplificación inespecíficos. La concentración final efectiva en la mayoría de las reacciones de amplificación se encuentra entre **0.2-0.5 µM**; utilizar 0.2 µM final de cada primer para la optimización inicial.

Programa de PCR: Ciertos parámetros de la programación afectan tanto la especificidad como la eficiencia de la amplificación. Estos parámetros incluyen la temperatura y tiempo de desnaturalización, anillamiento y elongación; y número de ciclos. Variaciones en el tamaño del producto de amplificación, en el origen del molde, y en la secuencia de los cebadores suelen requerir cambios en el programa de amplificación.

-Desnaturalización:

- Desnaturalización inicial: 2-5 min a 94-96 °C para moldes con ≤ 50% en GC y 5-10 min para ADN genómico o moldes con > 50% en GC.
- Desnaturalizaciones siguientes: 5-60 seg. a 94-96 °C.

-Anillamiento:

- Temperatura de anillamiento óptima: aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura de *melting* de los primers.
- Extensión del paso de anillamiento: 15-60 seg.

-Extensión:

- La temperatura de extensión óptima para la Biotools DNA Polymerase es 72°C. Para amplicones largos, se recomienda reducir esta temperatura a 68 °C.
- Período de extensión: 1 min/kb del producto de amplificación esperado.
- Una fase de extensión final de 3-10 min a 72°C es recomendable a fin de rellenar los productos de reacción incompletos.

-Número de Ciclos de amplificación:

- Número óptimo de ciclos: 25-35 ciclos; ocasionalmente pueden incrementarse hasta 40 ciclos, fundamentalmente cuando se utilizan moldes con bajo número de copias.

4. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Materiales a ser aportados por el usuario:

- Primer Downstream
- Primer Upstream
- Agua libre de nucleasas
- ADN molde

El flujo de trabajo en el laboratorio debe de ser unidireccional, desde el área de pre-amplificación hacia el área de amplificación. A fin de evitar contaminaciones cruzadas se recomienda utilizar equipamiento específico para cada área de trabajo.

1. Descongelar los primers y el ADN molde en hielo.
2. Calcular el número de reacciones necesarias; recordar incluir al menos una reacción control sin molde para descartar contaminantes en la mezcla de reacción.
3. Apartar el número de viales gelificados necesario. Examinar los tubos gelificados a fin de verificar que la DNA AmpliGel PLUS Master Mix no se encuentre hidratada.
4. Colocar los viales de reacción en gradillas a fin de facilitar la manipulación.
5. Agregar los primers y el ADN molde dentro de los viales que contienen la mezcla DNA AmpliGel PLUS Master Mix.
6. Completar con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 25 µl. Despreciar el volumen del gel.

Cantidades de molde y primers recomendadas

Componente	Concentración final
Primer forward	0.1-1.0 µM
Primer reverse	0.1-1.0 µM
ADN molde*	Plásmidos: 0.1 pg-10 ng ADNg: 0.1-500 ng

*Comenzar con 10 pg para moldes simples (ADN de plásmidos o fagos), o 10 ng para moldes complejos como ADNg.

Cantidades de molde y primers recomendadas

Componente	25 µl rxn
Primer forward	2.5-25 pmol (x µl)
Primer reverse	2.5-25 pmol (x µl)
ADN molde *	variable (x µl)
Agua libre de nucleasas	Hasta completar 25 µl

Nota: La cantidad de ADN y primers deberá ser optimizada experimentalmente para cada nueva combinación de molde y primer. Las condiciones de reacción descritas en este protocolo son sólo recomendaciones generales.

7. Mezclar el contenido del tubo agitándolo con el dedo y dar un *spin* antes de iniciar el ciclo.

Nota: A fin de lograr un **efecto Hot Start** se recomienda no resuspender el contenido del gel. Los reactivos gelificados se resuspenderán durante el paso de desnaturalización inicial.

8. Para termocicladores sin tapa calefactora añadir una capa de aceite mineral.
9. Cerrar los viales, colocarlos en el termociclador e inicial el programa de amplificación seleccionado.

Programa de Amplificación Estándar

Pasos	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	94 °C	2-5 min
Desnaturalización Anillamiento Extensión*	25-35	94 °C	15-60 seg
		T _m -5 °C	15-60 seg
		72-74 °C	60 seg/kb
Extensión Final (opcional)	1	72-74 °C	3-10 min
Enfriamiento	∞	4 °C	∞

10. Cargar 5-15 µl de la mezcla de reacción en un gel de agarosa para analizar los productos de amplificación.

5. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Ausencia de amplificación o baja eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del ADN molde.** Corroborar la calidad y cantidad del molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Algunos protocolos de purificación de DNA pueden co-purificar inhibidores de la amplificación. Reducir el volumen de molde en la reacción o diluirlo antes de incorporarlo a la mezcla de reacción. La precipitación de ADN con etanol, seguida de varios lavados del *pellet* con etanol 70% suele ser efectiva para eliminar cantidades trazas de contaminantes presentes en la muestra.
ADN molde dañado o degradado. Almacenar el ADN en condiciones adecuadas a fin de evitar su degradación. Un exceso de molde o un molde de mala calidad reducen el rendimiento de la reacción de amplificación.
2. **Rediseñar los primers.** Diseñar primers con una temperatura de anillamiento superior y que no formen horquillas y/o dímeros entre sí.
3. **Optimizar la concentración de primers.** Si bien una concentración baja de cebadores puede evitar la formación de dímeros, una concentración suficiente de los mismos es necesaria para el correcto rendimiento de la PCR. En caso necesario incrementar la concentración de primers en la mezcla de reacción en incrementos de 0.1 µM.
4. **Incrementar el tiempo de desnaturalización inicial.** Durante los primeros ciclos de amplificación es muy importante garantizar que el molde se encuentre completamente desnaturalizado. Para moldes con elevado contenido en GC o ricos en estructuras secundarias se recomienda prolongar el paso de desnaturalización inicial (≤ 10 min).
5. **Reducir la temperatura de anillamiento.** Reducir la temperatura de anillamiento en decrementos de 2 °C. Recordar que la inclusión de aditivos en la reacción de amplificación suele afectar la temperatura de anillamiento de los primers.
6. **Incrementar el número de ciclos.** Incluir un número adicional de ciclos de amplificación en incrementos de 5 ciclos. Ocasionalmente, un número máximo de 40 ciclos suele mejorar el rendimiento de aquellas PCRs que pretendan amplificar moldes de bajo número de copias.
7. **Cambios en el paso de extensión.** Incrementar el tiempo de extensión en incrementos de 30 seg. Para productos de amplificación largos se recomienda reducir la temperatura de extensión a 68 °C.
8. **Incorporar aditivos en la mezcla de reacción.** La inclusión de agentes facilitadores (ej. DMSO o betaína) o estabilizantes convencionales (ej. albúmina) puede mejorar el rendimiento de la reacción de amplificación.

Productos de amplificación inespecíficos o *smear*

1. **Reducir la concentración de los componentes de reacción.** Corroborar la concentración de ADN molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Reducir la cantidad de molde y/o primers en la mezcla de reacción.
2. **ADN molde dañado o degradado.** Almacenar el ADN en condiciones adecuadas a fin de evitar su degradación. Moldes degradados favorecen la generación de productos de amplificación inespecíficos o *smear*.
3. **Corroborar el estado de los primers.** Corroborar que los primers no se encuentren degradados realizando una electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante.
4. **Rediseñar los primers.** Diseñar primers con una T_m superior y que no formen horquillas y/o dímeros entre sí.
5. **Incrementar la temperatura de anillamiento.** Incrementar la temperatura del paso de anillamiento en incrementos de 2°C.
6. **Reducir el número de ciclos de amplificación.** Disminuir el número de ciclos en decrementos de 5 ciclos.
7. **DNA AmpliGel PLUS Master Mix hidratada.** Si la conservación de los viales no se realiza en las condiciones adecuadas, la mezcla de reacción puede hidratarse durante su almacenamiento. Descartar los viales que se encuentren en mal estado.

6. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Formato	Referencia
DNA AmpliGel PLUS Master Mix-Strips	12 x 8-tube strips	10.551
DNA AmpliGel Master Mix-Strips	12 x 8-tube strips	10.541
DNA AmpliGel Master Mix-Plates	10 x 96-well plates	10.545
DNA AmpliGel Master Mix-Plates	20 x 96-well plates	10.546