

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 AmpliTools Complex Master Mix

REF.	FORMATO	CONTENIDO
4519	250 rxn de 25 µL	DNA AmpliTools Complex Master Mix
4520	500 rxn de 25 µL	DNA AmpliTools Complex Master Mix

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 02 – Febrero 16

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

La **DNA AmpliTools Complex Master Mix** de Biotools es una *master mix* 2X optimizada para conseguir el máximo rendimiento y especificidad en reacciones de amplificación a partir de moldes de ADN complejos (ADNs genómicos, moldes ricos en GC, moldes con estructuras secundarias) y/o escasos.

ADN genómico, moldes ricos en GC o con estructura secundaria son difíciles de amplificar. La razón principal de esta dificultad es que las polimerasas convencionales introducen errores durante la replicación del ADN que puede provocar una detención de la reacción de amplificación originando productos truncados y/o acumulación de errores en la secuencia amplificada comprometiendo el rendimiento y la fidelidad de la PCR.

La DNA AmpliTools Complex Master Mix solventa estas dificultades incorporando una mezcla de enzimas altamente eficiente que incluye Biotools HotSplit DNA Polymerase con efecto *hot start* y Biotools Pfu DNA Polymerase con actividad correctora de errores. La combinación de estas enzimas, junto con el buffer de reacción especial y los cofactores incluidos en la mezcla, consiguen un alto rendimiento y fidelidad de copia en reacciones de amplificación complejas. La naturaleza *hot start* de la HotSplit DNA Polymerase contribuye significativamente a la especificidad conseguida con la DNA AmpliTools Complex Master Mix porque reduce la formación de dímeros de *primers* y productos de amplificación inespecíficos.

Aplicaciones de la DNA AmpliTools Complex Master Mix:

- ✓ Amplificación de moldes de ADN ricos en GC
- ✓ Amplificación de moldes de ADN ricos en estructuras secundarias
- ✓ Amplificaciones a partir de baja concentración de molde (límite de detección 0.1 pg)
- ✓ Amplificación de fragmentos hasta 10 kb (DNA genómico)
- ✓ Amplificación de fragmentos hasta 30 kb (DNA de lambda)

Componentes: La DNA AmpliTools Complex Master Mix contiene Biotools HotSplit DNA Polymerase; Biotools Pfu DNA Polymerase; dNTPs; MgCl₂; Buffer de Reacción; adyuvantes y estabilizantes a concentraciones idóneas para llevar a cabo una amplia gama de reacciones de amplificación de ADN.

2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Almacenar los viales de DNA AmpliTools Complex Master Mix a -20°C en un congelador que garantice una temperatura constante (no se recomiendan congeladores *frost-free*). Para uso frecuente del kit se recomienda realizar alícuotas a fin de evitar ciclos frecuentes de congelación/descongelación.

Si el producto se manipula y conserva siguiendo estas recomendaciones, su estabilidad será la indicada en la etiqueta correspondiente.

3. INSTRUCCIONES DE USO

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 inhibir 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. Para ADN de baja complejidad (ej. plásmido, lambda o ADN bacteriano) recomendamos **0.2-10 ng** y para moldes complejos (ADN genómico humano) **10-250 ng**; utilizar 1 ng y 50 ng, respectivamente para la optimización inicial. El exceso de molde incrementa la formación de productos de amplificación inespecíficos y reduce el rendimiento de la reacción.

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 DNA AmpliTools Complex Master Mix 1X es de **2 mM**, concentración idónea para la mayoría de los amplicones.

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 los anillamientos inespecíficos.

La cantidad óptima de ADN y cebadores en la PCR deberá ser determinada experimentalmente para cada nueva combinación de molde y primer. Para amplificaciones complejas con DNA AmpliTools Complex Master Mix la concentración óptima se encuentra entre **0.3-0.7 µM**; utilizar 0.5 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; entre los que se 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.

Cuando se utilizan *primers* con temperatura de anillamiento superior a 60 °C, puede aplicarse un protocolo de amplificación en dos pasos.

-Desnaturalización:

- Desnaturalización inicial: La activación de la *HotSplit DNA Polymerase* se lleva a cabo durante esta fase del ciclo de amplificación. 5 min a 94-96 °C es suficiente para moldes con $\leq 50\%$ en GC y 8 min para ADN genómico o moldes con $> 50\%$ en GC.
- Desnaturalizaciones siguientes: 25-30 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: 10-15 seg.

-Extensión:

- La temperatura de extensión óptima para la mezcla de enzimas incluidas en la DNA AmpliTools Complex Master Mix es 72°C. Para amplicones largos (> 3 kb), se recomienda reducir esta temperatura a 68 °C.
- Período de extensión: 50 seg/kb del producto de amplificación esperado.
- Una fase de extensión final de 3-10 min a 68-72°C es recomendable a fin de rellenar los productos de reacción incompletos.

-Número de Ciclos de amplificación:

- Número óptimo de ciclos: 30-35 ciclos; ocasionalmente pueden incrementarse hasta 40 ciclos, fundamentalmente cuando se utilizan moldes con bajo número de copias.

Condiciones de reacción: La DNA AmpliTools Complex Master Mix (2X) deberá utilizarse a una concentración final 1X en la mezcla de reacción que incluirá los primers y el molde de ADN. El volumen de reacción recomendado es de **25 μ L**.

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 la DNA AmpliTools Complex Master Mix, los primers y el ADN molde en hielo. Mantener los reactivos en frío durante la preparación de la mezcla de reacción.
2. Calcular el número de reacciones necesarias; recordar incluir al menos una reacción control sin molde para descartar contaminantes en la reacción.
3. **Mezclar la DNA AmpliTools Complex Master Mix** antes de utilizarla a fin de prevenir una concentración de sales localizada.

Nota: La HotSplit DNA Polymerase incluida en la mezcla es activada durante la fase de desnaturalización inicial.

4. Preparar las mezclas de reacción siguiendo las instrucciones de la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la Mezcla de Reacción

COMPONENTE	Conc. Final	Volumen para 25 μ l rxn
DNA AmpliTools Complex Master Mix (2X)	1 X	12.5 μl
Primer forward	0.5 μ M	12.5 pmol (x μ l)
Primer reverse	0.5 μ M	12.5 pmol (x μ l)
Agua libre de nucleasas	-	hasta 25 μ l
ADN molde*	variable	x μ l

ADN molde* | ADNs simples: 0.2-10 ng
| ADNg complejos: 10-250 ng

*Comenzar con **1ng** para moldes simples, o **50 ng** para moldes complejos.

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.

5. Mezclar los componentes de reacción mediante vortex y aplicar un *spin* antes de iniciar el ciclado.
6. Colocar los viales en el termociclador previamente calentado e iniciar el programa de amplificación seleccionado.

Tabla 2. Programa de Amplificación Estándar

Pasos	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	94-96 °C	5-8 min
Desnaturalización Anillamiento Extensión	25-35	94-96 °C	20-30 seg
		T _m -5 °C	10-15 seg
		68-72 °C	50 seg/kb
Extensión Final	1	68-72 °C	5-10 min

7. Cargar 20-40% 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 ADN pueden copurificar 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. Comenzar la optimización con 0.5 μ M de cada primer y en caso necesario incrementar su concentración en incrementos de 0.1 μ M.
4. **Mezclar la DNA AmpliTools Complex Master Mix.** Antes de pipetear el volumen necesario, la master mix 2X deberá ser mezclada exhaustivamente a fin de garantizar su homogeneidad.
5. **HotSplit DNA Polymerase no ha sido activada.** Corroborar que las condiciones aplicadas a la fase de desnaturalización inicial sean las recomendadas: 5-8 min a 94-96 °C.
6. **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 a 8 min.
7. **Reducir la temperatura de anillamiento.** Reducir la temperatura de anillamiento en decrementos de 2 °C.
8. **Incrementar el número de ciclos.** Incluir un número adicional de ciclos de amplificación en incrementos de 5 ciclos. Ocasionalmente, un número máximo de 45 ciclos suele mejorar el rendimiento de aquellas PCRs que pretendan amplificar moldes con bajo número de copias o moldes complejos.
9. **Cambios en el paso de extensión.** Incrementar el tiempo de extensión en incrementos de 30 seg. Para productos de amplificación largos (> 3 kb) se recomienda reducir la temperatura de extensión a 68 °C.

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 tiempo de anillamiento.** El tiempo de anillamiento recomendado a utilizar con la DNA AmpliTools Complex Master Mix es de 10 seg y nunca superior a 15 seg.
7. **Reducir el tiempo de extensión.** Para moldes simples el tiempo de extensión puede reducirse a 30-40 seg/kb.
8. **Reducir el número de ciclos de amplificación.** Disminuir el número de ciclos en decrementos de 5 ciclos.
9. **Contaminantes en la mezcla de reacción.** Si se observan bandas de amplificación en el control negativo, cambiar la totalidad de los reactivos incluidos en la mezcla.

6. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Formato	Tamaño	Referencia
DNA AmpliTools Complex Master Mix	250 rxns de 25 μ l	1 x 3.4 mL	4519
DNA AmpliTools Complex Master Mix	500 rxns de 25 μ l	2 x 3.4 mL	4520