

GARANTÍA

BIOTOOLS garantiza la conformidad de los productos con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante un 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 9001:2000 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

© 2008 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.

BIOTOOLS DNA POLYMERASE (5 U/μL)

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.042	500 U	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Standard Reaction Buffer with MgCl ₂
10.043	1000 U	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Standard Reaction Buffer with MgCl ₂
10.044	5000 U (5x1000 U)	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Standard Reaction Buffer with MgCl ₂
10.047	500 U	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE
10.048	1000 U	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE
10.049	5000 U (5x1000 U)	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE
4547	10000 U	Biotoools DNA Polymerase (5 U/μL) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE

Conservar 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 del 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 09 - Julio 2015

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

BIOTOOLS DNA Polymerase es una variante genéticamente modificada de la enzima homónima de *Thermus s.p.*, expresada en *E. coli*. Su uso está especialmente indicado para aquellas aplicaciones que requieran una enzima altamente termoestable y procesiva capaz de sintetizar cadenas de ADN a elevadas temperaturas en reacciones de amplificación o similares (ej. *primer extension*).

Debido a su gran procesividad y fidelidad de copia BIOTOOLS DNA Polymerase permite la generación de ADN (de hasta 5 kb) con una tasa de error (1-10 x 10⁻⁶ bp) inferior a la de la mayoría de las *Taq* ADN polimerasas comerciales.

El procedimiento empleado para la separación y purificación de enzimas termoestables, propiedad de Biotoools, consiste en un método de separación no cromatográfico que permite obtener enzimas con un elevado grado de pureza.

La enzima incluida se suministra a una **concentración 5 U/μL** en el buffer de almacenamiento. Esta concentración es óptima para experimentos de amplificación que requieran un volumen de reacción reducido.

Aplicaciones del producto:

- PCR estándar
- PCR *multiplex*
- PCR *in situ*
- Secuenciación de ADN

2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA

Concentración suministrada:.....	5 U/μL
Funcionamiento:	
Concentración de trabajo	20-25 mU/μL
pH	8-9
Temperatura de extensión.....	72°C
Concentración de MgCl ₂	2 mM
Tamaño de los productos de PCR:.....	Hasta 5 kb
Tipo de clonaje:.....	T/A
Actividad endonucleasa:.....	No
Actividad reverso transcriptasa:.....	No
Actividad 5'→3' exonucleasa:.....	Si
Actividad 3'→5' exonucleasa:.....	No
Actividad tipo <i>nicking</i> :.....	No

Esta enzima no está recomendada para amplificación de secuencias homólogas a *E. coli*.

3. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Conservar a -20°C en un **congelador que garantice una temperatura constante** (no se recomiendan congeladores *frost-free*). En estas condiciones, la enzima será estable hasta la fecha indicada en la etiqueta correspondiente.

4. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

Definición de Unidad- cantidad de enzima que incorpora 10 nano-moles de dNTPs en ADN ácido-insoluble en 30 minutos a 72 °C.

Buffer de Almacenamiento- Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), KCl 50 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.1%, glicerol 50% (v/v).

10X Reaction Buffer- Tris HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM. El denominado **10X STANDARD REACTION BUFFER with MgCl₂ incluye 20 mM de MgCl₂** en su composición.

5. CONSIDERACIONES GENERALES

Concentración de Enzima

Biotoools DNA Polymerase es apta para su uso tanto en aplicaciones de PCR estándar como aquellas más especializadas. Como guía inicial se recomiendan las siguientes cantidades de enzima por reacción.

Volumen de Reacción Final	Unidades de enzima
100 μL	Hasta 2.5 U
50 μL	1-1.25 U
25 μL	0.5-0.625 U

El añadir mayor cantidad de enzima no asegura un mayor rendimiento de la reacción, solamente en aplicaciones específicas como la amplificación de fragmentos de gran tamaño (> 2 kb de ADN genómico) puede ser necesario incrementar la cantidad de enzima en la reacción.

ADN Molde

Tanto la calidad así como la cantidad de ADN molde afectan la sensibilidad y la eficiencia de la reacción de amplificación. La utilización de altas concentraciones de ADN puede favorecer la aparición de productos de reacción inespecíficos.

Si sospecha la presencia de inhibidores de PCR en la muestra de molde (ej. detergentes iónicos, fenol, *dyes*, etc.), utilice un menor volumen de molde o realice diluciones del ADN molde; en ocasiones puede ser necesario re-purificar el ADN precipitando con etanol.

Concentración de dNTPs

Generalmente se utilizan cantidades equimolares de dNTPs. La concentración de cada dNTP en la PCR suele ser de 50-500 μM, siendo 200 μM la concentración estándar de uso. Biotoools ofrece mezclas equimolares de los cuatro dNTPs (10 mM y 25 mM de cada uno).

La concentración de dNTPs puede disminuirse (ej. cuando existen amplificaciones inespecíficas) o aumentarse (cuando se amplifican fragmentos de gran tamaño), incluso se pueden desequilibrar a favor de algún dNTP en concreto (ej. para mutagénesis *in vitro*).

Los dNTPs se comportan como quelantes del catión Mg²⁺. Si se aumenta la concentración de dNTPs en una reacción de amplificación, se deberá aumentar en paralelo la concentración de MgCl₂.

Biotoools DNA Polymerase puede emplearse en reacciones de amplificación con dNTPs modificados con marcajes radioactivos o con fluoresceína. También puede utilizarse con dUTP y otros análogos.

Buffer de Reacción

El buffer incluido ha sido especialmente formulado para llevar a cabo todo tipo de reacciones de amplificación. El objetivo del buffer es crear las condiciones de reacción apropiadas para que los primers hibriden en un amplio rango de temperatura. En la composición del *Standard Reaction Buffer with MgCl₂*, se incluye iones Mg²⁺ a una concentración final de 2 mM.

Concentración de MgCl₂

El usuario tiene que determinar experimentalmente la concentración óptima de MgCl₂ para su ensayo. Biotoools recomienda comenzar con una concentración de entre 1.5-2 mM, la óptima para la mayoría de reacciones testadas ha sido 2 mM. Una concentración elevada de MgCl₂ reduce la fidelidad de copia de la polimerasa y pueden inducir la formación de amplicones inespecíficos; en tanto que una concentración baja puede reducir el rendimiento de la reacción.

Si las muestras incluyen en su composición agentes quelantes de metales como EDTA, incremente la concentración de MgCl₂ en la mezcla de reacción.

Diseño de los Primers

Los primers utilizados en la reacción de PCR usualmente poseen un tamaño de 15-30 nucleótidos con un contenido en G+C entre 40-60%. Para evitar la formación de dímeros de primer o de horquillas, los primers no deben de ser complementarios consigo mismos o con otros primers presentes en la reacción.

La temperatura de anillamiento de los primers debe de ser similar con un máximo de 5°C de diferencia entre ellos. Para seleccionar los primers se debe tener en cuenta tanto el contenido en G+C como el tamaño de los mismos. El extremo 5' del primer puede contener bases desapareadas con el ADN molde, sin embargo no es recomendable que esto ocurra en el extremo 3'.

Aditivos de la Reacción de PCR

En reacciones de amplificación complejas puede ser necesario incluir DMSO, betaina, formamida, entre otros. En caso de utilizar aditivos es importante considerar que suelen disminuir la temperatura de *melting* de los primers.

6. PROTOCOLO DE USO

Las condiciones óptimas deben de ser determinadas por el usuario.

Trabaje en el área de preparación de reactivos en una cabina de flujo laminar. Esta área debe de encontrarse separada del área de preparación de ADN y del área de PCR. Para evitar contaminaciones utilice guantes, puntas de pipeta y tubos libres de nucleasas.

1. Descongele los reactivos en hielo. Después de descongelar mezcle bien y centrifugue. Mantenga los reactivos en hielo.

2. Prepare la master mix en un tubo de reacción estéril siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. En cada experimento incluya al menos un control negativo (NTC sin ADN molde). Prepare la master mix para varias reacciones más de las necesarias.

TABLA 1. Preparación de la Master Mix

COMPONENTE	CONC FINAL	50 µL rxn	20 µL rxn
Master Mix			
10X REACTION BUFFER	1X	5 µL	2 µL
50 mM MgCl ₂ solution*	1.5-4 mM	1.5-4 µL	0.6-1.6 µL
dNTP Mix 10 mM each	200 µM de c/u	1 µL	0.4 µL
Primers	variable	variable	variable
DNA Polymerase (5 U/µL)	20-25 mU/µL	0.2-0.25 µL	0.08-0.1 µL
Agua bidestilada estéril	-	Hasta 50 µL	Hasta 20 µL
ADN Molde	Variable	Variable	Variable

*No necesario para 10X Standard Reaction Buffer, este buffer incluye MgCl₂

3. Mezcle la master mix y manténgala en hielo. Distribuya el volumen apropiado en cada vial.

Proceda a trabajar en el área de purificación de ADN separada de otras fuentes de ADN.

4. Añada el ADN molde a los viales de reacción, ciérrelos y mezcle cuidadosamente. En termocicladores sin tapa calefactora añada una capa de aceite mineral.

Proceda al área de amplificación o PCR

5. Programe el termociclador según la guía de la Tabla 2 (véase la sección 7). Coloque los viales en el termociclador y ejecute el programa de amplificación seleccionado.

TABLA 2. Programa de Amplificación Estándar*

PASOS	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	1	94°C	3-10 min**
Desnaturalización	25-35*	94°C	5-60 seg
Anillamiento		T _m -5°C	30-60 seg
Extensión		72°C	60 seg/1 kb
Extensión Final	1	72°C	5-15 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

*Optimice el tiempo, la temperatura y el número de ciclos de la PCR.

**Dependiendo del molde.

7. GUÍA PARA EL PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Desnaturalización Inicial- La desnaturalización inicial no debe prolongarse más de lo necesario a fin de evitar que la inactivación de la enzima. Sin embargo, en caso de ser insuficiente afectará la eficiencia y el rendimiento de la reacción. Generalmente 3-5 min a 94°C suele ser suficiente; cuando el molde posee un elevado contenido de G+C, incrementar el tiempo hasta 10 min.

Paso de Desnaturalización-El producto de amplificación obtenido es menor que el ADN molde, por lo cual el tiempo de desnaturalización en cada ciclo es inferior al de la desnaturalización inicial; 5-60 seg. a 94°C suelen ser suficientes.

Paso de Anillamiento-Si los primers tienen <20 bases la temperatura de anillamiento suele ser igual a la del primer con menor T_m. Para calcular la temperatura óptima de anillamiento se puede emplear un gradiente de temperatura. Comience utilizando una temperatura de anillamiento 5°C inferior de la T_m teórica de ambos primers. Si los primers tienen una temperatura de anillamiento elevada se puede realizar la PCR en dos pasos.

Paso de Extensión-El paso de extensión del ADN molde se realiza a 70-75°C. El tiempo de esta etapa está en función del tamaño del producto de amplificación esperado, para esta enzima se recomienda 1 min/kb.

Número de Ciclos-El número de ciclos estándar suele ser de 25-35, dependiendo de la cantidad de molde y del rendimiento esperado. El incremento en el número de ciclos puede generar productos inespecíficos que reducen la eficiencia de la reacción de amplificación. Determine experimentalmente el número óptimo de ciclos de su reacción.

Paso de Extensión Final-Una vez finalizado el ciclo de amplificación, se recomienda incubar a 72°C durante 5-15 min a fin de que la ADN polimerasa rellena los extremos de los productos recientemente sintetizados y añade oligonucleótidos de adenina extras en el extremo 3' de los amplicones.

8. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa	Recomendación
Ausencia de amplificación o baja eficiencia de la reacción	Error de pipeteo o ausencia de algún reactivo	Verifique la concentración y condiciones de almacenamiento de dNTPs, primers, etc. Repita el ensayo asegurándose de que no falte ningún reactivo.
	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, ej. alto contenido en G+C, se recomienda añadir DMSO a la reacción. Repita la reacción de PCR con una dilución del ADN molde o con una alícuota diferente.
	Problemas con los primers	Revise el diseño de los primers y sus condiciones de almacenamiento. 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 electroforesis en gel de poliacrilamida.
	Concentración no óptima de Mg ²⁺	Repita la PCR con diferente concentración de MgCl ₂ entre 1.5-4 mM en incrementos de 0.25 mM.
	Baja concentración de enzima	Aumente la concentración de enzima en incrementos de 0.2 U
	Programa de PCR no óptimo	Verifique los siguientes parámetros del programa de amplificación: Desnaturalización- aumente la temperatura y el tiempo de la desnaturalización inicial. Anillamiento- disminuya la temperatura de anillamiento y optimice el tiempo (véase sección 7). Tiempo de extensión- incremente el periodo de extensión en incrementos de 30 seg. Número de ciclos- incremente el número de ciclos en incrementos de 5 ciclos. Revise el periodo final de elongación en el programa.
	Problemas con los primers	Revise el diseño de los primers y sus condiciones de almacenamiento. Normalmente la concentración de los primers es equimolar. Revise la concentración de los primers y titule si es necesario. Reduzca la concentración de primers, en decrementos de 0.1 µM. Verifique que los primers no se encuentren degradados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
	Exceso de ADN molde	Utilice una dilución del ADN molde.
	Contaminación	Prepare siempre un control negativo (NTC <i>no template control</i>) Si en el NTC aparecen bandas o <i>smear</i> cambie de reactivos.
	Concentración de enzima muy elevada	Optimice la concentración de enzima para su ensayo.
Programa de PCR no óptimo	Para aumentar la especificidad puede utilizar un programa <i>touchdown or stepdown</i> . Reduzca el número de ciclos. Aumente la temperatura de anillamiento en incrementos de 1°C.	
Concentración no óptima de Mg ²⁺	Repita la PCR con diferente concentración de MgCl ₂ entre 1.5-4 mM en incrementos de 0.25 mM.	
Amplificación en el control negativo	Contaminación	Cambie todos los reactivos utilizados

9. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Componentes	Referencias						
	10.042	10.043	10.044	10.047	10.048	10.049	4547
Biotools DNA Polymerase (5 U/µL)	500 U	1000 U	5 x 1000U	500 U	1.000 U	5 x 1000U	10.000 U
10X Standard Reaction Buffer with MgCl₂	2 x 1.8ml	3 x 1.8ml	15 x 1.8ml				
10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE				2 x 1.8ml	3 x 1.8ml	15 x 1.8ml	1 x 55ml
50 mM MgCl₂ Solution				1 x 1.8ml	2 x 1.8ml	10 x 1.8ml	1 x 22ml