

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 HotSplit Master Mix

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.411	250 rxns de 25 µl	DNA AmpliTools HotSplit Master Mix
10.412	500 rxns de 25 µl	DNA AmpliTools HotSplit Master Mix

Almacenar a -20°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. 06 – Marzo 19

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

La **DNA AmpliTools Master Mix** de Biotools es una *master mix* 2X 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). La **DNA AmpliTools HotSplit Master Mix** permite amplificar fragmentos de ADN de hasta **10 kb de largo**.

La naturaleza *hot start* de la HotSplit DNA Polymerase, incluida en la mezcla, reduce significativamente la formación de dímeros de *primer* y productos de amplificación inespecíficos, además de facilitar la manipulación porque las mezclas pueden prepararse a temperatura ambiente.

El uso de la DNA AmpliTools HotSplit Master Mix permite conseguir reacciones de amplificación específicas simplificando considerablemente el proceso de optimización que es prácticamente inexistente. El formato de mezcla lista para utilizar minimiza las etapas de manipulación y reduce el riesgo de contaminación. Con la excepción de los primers y el ADN molde, la DNA AmpliTools HotSplit Master Mix (2X) proporciona todos los reactivos necesarios, a la concentración óptima, para una gran diversidad de amplificaciones utilizando diferentes volúmenes de reacción (20-50 µl).

La utilización de productos de la línea DNA AmpliTools 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 AmpliTools HotSplit Master Mix:

- ✓ PCR altamente específicas (hasta 10 kb)
- ✓ PCR rutinarias
- ✓ PCR a gran escala
- ✓ "Primer extension"
- ✓ Generación de productos de amplificación para clonaje
- ✓ Secuenciación de genes
- ✓ RT-PCR

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: La DNA AmpliTools HotSplit Master Mix contiene Biotools HotSplit 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 AmpliTools HotSplit 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.

Para almacenamientos cortos o uso frecuente, la DNA AmpliTools HotSplit Master Mix puede conservarse a 2-8°C durante 3 meses, dependiendo de su fecha de expiración.

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

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

Aditivos: La amplificación de moldes complejos puede mejorar el rendimiento con la inclusión de aditivos en la reacción (ej. DMSO o betaína). La DNA AmpliTools HotSplit Master Mix es compatible con los aditivos de PCR convencionales.

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 molde y primers en la PCR deberá ser determinada experimentalmente para cada nueva combinación de molde y primer. Si bien la concentración de primers recomendada es 0.1-1.0 µM; la efectiva en la mayoría de PCRs con DNA AmpliTools HotSplit Master Mix 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; 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 5-10 min para ADN genómico o moldes con $> 50\%$ en GC.
- Desnaturalizaciones siguientes: 15-60 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 HotSplit 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.

Condiciones de reacción: La DNA AmpliTools HotSplit Master Mix (2X) deberá ser utilizada a una concentración final 1X en la mezcla de reacción que además incluirá los primers y el molde de ADN. Esta mezcla funciona para volúmenes de reacción de 20, 25 y 50 μ l.

4. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Esta guía es para reacciones de amplificación convencionales. La amplificación de moldes con elevado contenido en GC o en estructuras secundarias, moldes de baja concentración, o amplicones > 5 kb pueden requerir mayor optimización.

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 HotSplit Master Mix, los primers y el ADN molde.
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. Mezclar la DNA AmpliTools HotSplit Master Mix antes de utilizarla a fin de prevenir una concentración de sales localizada; dar un *spin* después de mezclar.

Nota: Debido a la naturaleza "hot start" de la polimerasa incluida en la mezcla, las reacciones pueden prepararse a temperatura ambiente. La HotSplit DNA Polymerase es activada durante la fase de desnaturalización inicial.

4. Preparar una de las siguientes mezclas de reacción:

COMPONENTE	Conc. Final	Volumen para 20 μ l rxn	Volumen para 25 μ l rxn	Volumen para 50 μ l rxn
DNA AmpliTools HotSplit Master Mix (2X)	1 X	10 μ l	12.5 μ l	25 μ l
Primer forward	0.1-1 μ M	2.0-20 pmol (x μ l)	2.5-25 pmol (x μ l)	5.0-50 pmol (x μ l)
Primer reverse	0.1-1 μ M	2.0-20 pmol (x μ l)	2.5-25 pmol (x μ l)	5.0-50 pmol (x μ l)
Agua libre de nucleasas	-	hasta 20 μ l	hasta 25 μ l	hasta 50 μ l
ADN molde*	variable	x μ l	x μ l	x μ l

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.

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. Para termocicladores sin tapa calefactora añadir una capa de aceite mineral.
7. Colocar los viales en el termociclador previamente calentado a 95 °C e iniciar el programa de amplificación seleccionado.

Programa de Amplificación Estándar

Pasos	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	95 °C	5 min
Desnaturalización Anillamiento Extensión	25-35	95 °C	15-60 seg
		T _m -5 °C	15-60 seg
		68-72 °C	60 seg/kb
Extensión Final (opcional)	1	68-72 °C	5 min
Enfriamiento	∞	4 °C	∞

8. Cargar 20-50% 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 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 μ M.
4. **HotSplit DNA Polymerase no ha sido activada.** Corroborar que las condiciones aplicadas a la fase de desnaturalización inicial sean las recomendadas: 5 min a 95 °C.
5. **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).
6. **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.
7. **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 con bajo número de copias.
8. **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.
9. **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. **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 HotSplit Master Mix	250 rxns de 25 μ l	1 x 3.44 ml	10.411
DNA AmpliTools HotSplit Master Mix	500 rxns de 25 μ l	2 x 3.44 ml	10.412