

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.

BIOTOOLS HOTSPLIT DNA POLYMERASE (5 U/μl)

REF.	FORMATO	CONTENIDO
4549	500 U	BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase (5 U/μl) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE
4550	1000 U	BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase (5 U/μl) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE

Almacenar a -20°C

Aviso a compradores/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 2016

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase es una polimerasa "hot start" con alta eficiencia y fidelidad de copia. La tecnología empleada en la BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase está basada en el uso de grupos bloqueantes termolábiles que actúan directamente sobre los residuos aminoacídicos que intervienen en la reacción de polimerización. La actividad polimerasa es inhibida de manera reversible y la enzima recupera su actividad durante la fase de desnaturalización inicial, cuando la reacción de amplificación se incuba a 94-95 °C durante 5 minutos

La enzima incluida se suministra a una **concentración 5 U/μl** en el buffer de almacenamiento.

Aplicaciones o usos del producto:

- PCR altamente específicas
- PCR altamente sensibles
- PCR estándar
- PCR múltiple
- qPCR

2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA

Concentración:	5 U/μl
Actividad óptima:	
Concentración de trabajo ..	20-40 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' correctora de errores:	No
Actividad tipo nicking:	No

Esta enzima no está recomendada para experimentos que utilicen 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 es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial.

4. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

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

Storage Buffer- Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0.1% y glicerol 50% (v/v).

10X Reaction Buffer FREE- Tris HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM, y (NH₄)₂SO₄ 200 mM.

5. CONSIDERACIONES GENERALES

Concentración de Enzima

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

Volumen de Reacción Final	Unidades de enzima recomendadas
100 μl	2.0-3.0 Unidades
50 μl	1.0-1.5 Unidades
25 μl	0.5-0.75 Unidades

ADN Molde

La calidad y la cantidad de ADN molde afecta a la sensibilidad y la eficiencia de la reacción de amplificación.

Concentraciones elevadas de ADN pueden favorecer la formación de productos de amplificación inespecíficos. La reacción de PCR puede ser inhibida por varios componentes como detergentes iónicos, fenol, *dyes*, entre otros. Si el ADN contiene trazas de inhibidores, reduzca su presencia diluyendo la muestra o utilizando menor cantidad de molde. En caso necesario, re-purificar el ADN mediante precipitación con etanol seguido de varios lavados.

Concentración de dNTPs

El rango de concentración de cada dNTP en reacciones de amplificación es de 50-500 μM, siendo la concentración más usual 200 μM. La concentración de dNTPs puede disminuirse (ej. cuando existen amplificaciones inespecíficas) o aumentarse (cuando se amplifican fragmentos de gran tamaño), incluso se pueden desequilibrar en favor de algún dNTP en concreto (ej. experimentos in vitro de mutaciones).

Si se aumenta la concentración de dNTPs en una reacción de amplificación, se deberá aumentar a su vez la concentración de MgCl₂, pues los dNTPs se comportan como potentes agentes quelantes del catión Mg²⁺.

Biotools HotSplit DNA Polymerase puede emplearse con dNTPs modificados (ej. marcados). 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 apropiadas en cuanto a astringencia para que los primers hibriden en un amplio rango de temperatura. El 10X Reaction Buffer FREE no contiene detergentes.

Aditivos de la Reacción de PCR

La tecnología desarrollada para la enzima no es compatible con algunos aditivos de la PCR como por ejemplo DMSO. Cuando necesite emplear aditivos, testarlo previamente en una muestra control.

Concentración de MgCl₂

La concentración de MgCl₂ deberá ser optimizada experimentalmente para cada ensayo. El rango de concentración recomendado es de 1.5-4 mM; siendo 2 mM la óptima para la mayoría de los ensayos testados. Concentraciones elevadas de MgCl₂ pueden inducir la formación de productos de amplificación inespecíficos y baja fidelidad de copia; mientras que una concentración insuficiente puede reducir el rendimiento de la reacción de amplificación.

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

Diseño de los 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. La concentración de primers recomendada es 0.1-1.0 µM. La concentración final efectiva en la mayoría de PCRs se encuentra entre 0.2-0.5 µM; utilizar 0.2 µM final de cada primer para la optimización inicial.

6. PROTOCOLO DE USO

Las condiciones óptimas deben de ser determinadas para cada ensayo.

Trabaje con la enzima Biotools HotSplit DNA polymerase en condiciones de refrigeración.

Trabaje en el área de preparación de reactivos en una cabina de flujo laminar.

- Descongele y mantenga los reactivos en hielo. Después de descongelar mezcle bien con ayuda del vortex y centrífugue.
- Prepare la master mix siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. En cada experimento incluya al menos un control negativo (NTC sin molde). A fin de disponer de volumen suficiente, prepare reacciones extras de las necesarias.

TABLA 1. Preparación de la Master Mix.

COMPONENTE	CONC FINAL	VOL FINAL	
		50 µl rxn	20 µl rxn
Master Mix			
10X REACTION BUFFER	1X	5 µl	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)*	1.5-4 mM	1.5-4 µl	0.6-1.6 µl
dNTPs Mix	200 µM de c/u	variable	variable
Primers	0.1-1.0 µM	variable	variable
HotSplit DNA Polymerase (5U/µl)	20-40 mU/µl	0.2-0.4 µl	0.08-0.16 µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 50 µl	Hasta 20 µl
ADN Molde	Variable	Variable	Variable

*Optimice la concentración de MgCl₂; comience la optimización con 2 mM

- Mezcle bien la master mix y manténgala en hielo. Distribuya el volumen apropiado a cada vial.

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

- Añada el ADN molde a cada vial de reacción con la master mix. Cierre los viales y mezcle cuidadosamente. En termocicladores sin tapa calefactora añada una capa de aceite mineral.

Proceda al área de amplificación o PCR

- Programe el termociclador según la guía de la Tabla 2 (ver Punto 7). Coloque los viales en el termociclador y ejecute el programa seleccionado.

TABLA 2. Programa Estándar de Amplificación.

Pasos	Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial*	1	94°C	5-6 min*
Desnaturalización	25-35**	94°C	5-60 seg
Anillamiento		X°C	30-60 seg
Extensión		72°C	60 seg/100 bp
Extensión Final	1	72°C	5-15 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

*Durante el paso de desnaturalización inicial la enzima recupera su actividad.

**Optimice el tiempo, la temperatura y el número de ciclos (ver Punto 7).

9. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Componentes	Referencias	
	4549	4550
Biotools HotSplit DNA Polymerase (5 U/µl)	500 U	2 x 500 U
10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE	2 x 1.8ml	3 x 1.8ml
50 mM MgCl₂ Solution	2 x 1.8ml	2 x 1.8ml

7. GUÍA PARA EL PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Desnaturalización Inicial- Si el paso de desnaturalización inicial es incompleto se reducirá la eficiencia de la reacción de amplificación. Para la activación de la **BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase se requiere una fase de desnaturalización de 5 min a 94-95 °C**. Para moldes con elevado contenido de G+C suele ser necesario incrementar el tiempo de desnaturalización (hasta 10 min).

Paso de Desnaturalización- El producto de amplificación obtenido es menor que el molde por lo cual este periodo es más corto que el de desnaturalización inicial. Un periodo de desnaturalización de 5-60 seg. a 94°C es suficiente.

Paso de Anillamiento- Para calcular la temperatura óptima de anillamiento se puede emplear un gradiente de temperatura. Empezar utilizando una temperatura de anillamiento 5°C inferior de la Tm media de ambos primers. Si los primers tienen una temperatura de anillamiento elevada, puede utilizarse un programa de amplificación en dos pasos.

Paso de Extensión- Los primers una vez que han hibridado con el ADN molde se extienden a 68-74°C. El tiempo de la fase extensión está en función del tamaño del producto de amplificación esperado; para la **BIOTOOLS HotSplit DNA Polymerase** se recomienda utilizar 60 seg. por cada 1000 bp.

Número de Ciclos- El número de ciclos del programa normalmente es de 25-35 ciclos. Este parámetro depende de la cantidad del material de partida en la reacción y del rendimiento esperado. Un exceso de ciclos puede incrementar la cantidad de productos inespecíficos y reducir la eficiencia de reacción; determine experimentalmente el número de ciclos óptimo para cada ensayo.

Paso de Extensión Final- Una vez finalizado el ciclo de amplificación la muestra se puede incluir una fase de extensión final a 72°C durante 5-15 min. La ADN polimerasa rellena los extremos de los productos recientemente sintetizados y añade oligonucleótidos de adenina extra 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 calidad y cantidad del molde; no utilice ADN degradado. Si sospecha la presencia de inhibidores en la muestra, repita la PCR utilizando una dilución del molde o 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 (ver diseño de primers). Verifique que los primers no se encuentren degradados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Repita la PCR con diferente concentración de primers de 0.1-0.5 µM en incrementos de 0.1 µM.
	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.
	Concentración de enzima insuficiente	Aumente la concentración de enzima en incrementos de 0.2 U
	Programa de PCR no óptimo	Verifique los siguientes parámetros del ciclo (ver Punto 7): Desnaturalización- Para la activación de la enzima será necesario un periodo mínimo de 5 min a 94 °C . Anillamiento- Optimice la temperatura de anillamiento y el tiempo. Tiempo de extensión- Incremente la fase de extensión en incrementos de 30 seg. Número de ciclos- incremente el número de ciclos en incrementos de 5 ciclos.
	Bandas de amplificación inespecíficas o smear	Problemas con los primers
Exceso de ADN molde		Utilice una cantidad de molde inferior.
Concentración de enzima elevada		Optimice la concentración de enzima para su ensayo.
Programa de PCR no óptimo		Incremente la temperatura de anillamiento de los primers y/o reduzca el tiempo de esta etapa. Reduzca el número de ciclos.
Amplificación en NTC	Concentración de Mg ²⁺	Reduzca la concentración de Mg ²⁺ en decrementos de 0.25 mM.
	Contaminación	Si en el NTC aparecen bandas o <i>smear</i> cambie de reactivos.