

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 devuelto 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 *Pfu* DNA POLYMERASE (5 U/ μ l)

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.521	100 U	BIOTOOLS <i>Pfu</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE
10.522	250 U	BIOTOOLS <i>Pfu</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l) 10X Reaction Buffer MgCl ₂ FREE

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 03 - Marzo 2019

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

BIOTOOLS *Pfu* DNA Polymerase es una polimerasa termófila con actividad correctora de errores (*proof-reading*) debido a su actividad 3'-5' exonucleasa. Es una proteína recombinante, procedente de la bacteria hipertermófila *Pyrococcus furiosus*, expresada en *E. coli*.

BIOTOOLS *Pfu* DNA polimerase está indicada para reacciones de polimerización (ej. PCR, *primer extension*) que requieran una ADN polimerasa con alta fidelidad de copia. La tasa de error de esta enzima es un orden de magnitud inferior respecto a la de polimerasas que carecen de actividad *proof-reading*.

Esta enzima no presenta actividad endonucleasa, de tipo *nicking*, ni actividad 5'-3' exonucleasa. La BIOTOOLS *Pfu* DNA polimerase tampoco presenta actividad nucleotidil transferasa terminal por lo cual los productos de amplificación de *Pfu* se pueden utilizar directamente para clonar en vectores con extremos romos.

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

Aplicaciones del producto:

- PCR con alta fidelidad de copia
- Amplificación de fragmentos largos o complejos
- Clonaje
- Análisis de mutaciones
- Reacciones de PCR estándar
- PCR *in situ*

2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA

Concentración:	5 U/ μ l
Actividad óptima:	
Concentración de trabajo ..	20-50 mU/ μ l
pH ..	8-9
Temperatura de extensión ..	72-75 °C
Concentración de MgCl ₂ ...	2 mM
Tamaño de los productos de PCR:	Hasta 5 Kb
Tipo de clonaje:	Extremos romos
Actividad endonucleasa:	No
Actividad reverso transcriptasa:	No
Actividad 5' → 3' exonucleasa:	No
Actividad 3' → 5' exonucleasa:	Si
Actividad tipo <i>nicking</i> :	No

Esta enzima no está recomendada para experimentos que utilicen secuencias homólogas a *E. coli* o amplificaciones con temperaturas de annealing muy bajas (p.ej. RAPDs, Random Amplified Polymorphic DNAs)

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 nanomoles de dNTPs en ADN ácido-insoluble en 30 minutos a 72 °C.

Buffer de almacenamiento- Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), KCl 50 mM, NP40, 0.25%, Tween 20 0.25%, glycerol 40% (v/v).

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

5. CONSIDERACIONES GENERALES

Concentración de Enzima

Biotoools *Pfu* 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 μ l	2.0- 2.5 Unidades
50 μ l	1.0-1.25 Unidades
25 μ l	0.5-0.75 Unidades

El añadir mayor cantidad de enzima no asegura un mayor rendimiento de la reacción, solamente en algunas aplicaciones como PRIND (*Primed In Situ Syntesis*) o cuando se amplifica fragmentos de ADN de gran tamaño (mayores de 2 Kb de ADN genómico) puede ser necesario incrementar la concentración de la enzima.

ADN Molde

Tanto la calidad 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 el aumento de productos de reacción inespecíficos. La reacción de PCR puede ser inhibida por varios componentes ej. detergentes iónicos, fenol, dyes, etc. Si el molde contiene trazas de inhibidores, reduzca su presencia diluyendo la muestra, utilizando menor cantidad, o purificando el ADN mediante precipitación con etanol seguido de sucesivos lavados.

Concentración de dNTPs

El rango de concentración de cada dNTP en reacciones de amplificación es de 50-500 μ M, siendo la concentración más usual 200 μ M. 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. experimentos de mutagénesis "in vitro").

Si se incrementa la concentración de dNTPs en la PCR se deberá aumentar en paralelo la concentración de MgCl₂, pues los dNTPs se comportan como quelantes potentes del catión Mg²⁺.

La Biotoools *Pfu* DNA Polymerase puede emplearse en reacciones de amplificación con dNTPs modificados (ej. marcados). También puede utilizarse con dUTP u otros análogos.

Buffer de Reacción

El buffer de reacción 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.

Concentración de MgCl₂

La concentración óptima de MgCl₂ deberá ser optimizada experimentalmente para cada ensayo. Biotoools recomienda comenzar los ensayos con una concentración de MgCl₂ de 1.5-2 mM, concentraciones óptimas para la mayoría de los ensayos testados. Concentraciones elevadas de MgCl₂ pueden dar lugar a la formación de productos de amplificación inespecíficos y baja fidelidad de copia; en tanto que bajas concentraciones pueden reducir el rendimiento de la reacción.

Si las muestras incluyen en su composición agentes quelantes de metales como EDTA, se recomienda incrementar la concentración de MgCl₂ en la reacción.

Diseño de los Primers

La actividad 3'-5' exonucleasa de la *Pfu* DNA Polymerase puede degradar los primers generando productos de amplificación inespecíficos y un menor rendimiento de reacción. Para contrarrestar este efecto se recomienda diseñar primer más largos que los convencionales (20-35 bases) y con elevado contenido en G+C. Adicionalmente, los primers pueden ser protegidos por la incorporación de una unión fosforotioato única en el extremo 3'.

Para evitar la formación de dímeros de primer o de horquillas, los primers no deben de ser complementarios consigo mismos o con otros primers de la reacción. La temperatura de anillamiento de los primers debe de ser similar con un máximo de 5 °C de diferencia entre ellos.

El extremo 5' 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

Para amplificaciones complejas puede ser necesaria la incorporación de agentes adyuvantes como DMSO, betaína, formamida u otros. Tanto la enzima como el buffer de reacción incluidos son compatibles con la mayoría de aditivos. Tener en cuenta que ciertos aditivos disminuyen la temperatura de melting de los primers.

6. PROTOCOLO DE USO

Las condiciones óptimas deben de ser determinadas para cada experimento.

El área de preparación de reactivos debe de encontrarse separada del área de manipulación del ADN y del área de PCR.

- Descongele y mantenga los reactivos en hielo. Después de descongelar mezcle bien con ayuda de un vortex y centrifugue.
- Prepare la master mix siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. En cada experimento incluya al menos un control negativo (sin ADN molde). Prepare la master mix para varias reacciones más de las necesarias.

Nota 1: Se recomienda incorporar la *Pfu* DNA polimerasa al final a fin de evitar la degradación de los primers, en particular si se añade en ausencia de los dNTPs.

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 solution (50 mM)	1.5-4 mM	1.5-4 µl	0.6-1.6 µl
dNTP Mix 10 mM each	200 µM de cada dNTP	1 µl	0.4 µl
Primers	variable	variable	variable
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 50 µl	Hasta 20 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (5 U/µl)*	20-50 mU/µl	0.2-0.5 µl	0.08-0.2 µl
ADN Molde	Variable	Variable	Variable

*Ver Nota 1

- Mezcle los la master mix y distribuya el volumen apropiado en cada vial.

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

- Añada el ADN molde a cada vial de reacción. Cierre los viales y mezcle cuidadosamente. Para termocicladores sin tapa calefactora, añadir aceite mineral en los tubos de reacción.

Proceda al área de amplificación o PCR

- Programa el termociclador según la guía de la Tabla 2. Coloque los viales en el termociclador y ejecute el programa de PCR 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	5-30 seg
Anillamiento		T _m -5°C	30-60 seg
Extensión		72°C	2 min/1 Kb
Extensión Final	1	72°C	5-15 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

*Dependiendo del molde (ver Punto 7).

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

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. La desnaturalización inicial no debe prolongarse más de lo estrictamente necesario a fin de evitar que la inactivación de la enzima. Generalmente una temperatura de 94°C durante 3-5 minutos suele ser suficiente. Para moldes complejos (ricos en G+C o en estructuras secundarias) se recomienda incrementar el tiempo de desnaturalización (máximo 10 min).

Paso de Desnaturalización- El producto de amplificación obtenido es menor que el ADN molde por lo cual el periodo de desnaturalización es más corto que el de desnaturalización inicial. Un periodo de 5-30 seg. a 94°C suele ser suficiente.

Paso de Anillamiento- 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 media de ambos primers. Para primers con T_m elevada, puede utilizar un programa de amplificación de dos pasos.

Paso de Extensión- Los primers una vez que han hibridado con el ADN molde se extienden a 70-75°C. El tiempo del paso de extensión está en función del tamaño del producto de amplificación esperado. La *Pfu* DNA Polymerase por ser una enzima con actividad correctora de errores requiere un tiempo de extensión superior que el de otras polimerasas, se recomienda emplear aproximadamente 2 min/ Kb a amplificar.

Número de Ciclos- El número de ciclos del programa normalmente es de 25-35. Este parámetro depende de la cantidad del material de partida 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 reacción se puede incubar a 72°C durante 5-15 min. La *Pfu* DNA Polymerase no 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. Para moldes complejos se recomienda añadir adyuvantes como el DMSO a la reacción de amplificación.
	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. Incorpore la <i>Pfu</i> DNA Polymerase en último lugar a fin de evitar la degradación de los primers (ver Nota 1).
	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 cicloado (ver Punto 7): Desnaturalización- aumente la temperatura y el tiempo de la desnaturalización inicial. Anillamiento- Optimice la temperatura de anillamiento y el tiempo. Tiempo de extensión- Recuerde que por la actividad correctora de errores esta polimerasa requiere tiempos de elongación mayores a los de las polimerasas convencionales. Incremente el periodo 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	Revise el diseño de los primers y sus condiciones de almacenamiento. Verifique que los primers no se encuentren degradados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Reduzca la concentración de primers, decrementos de 0.1 µM.
	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	Incrementa 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 smear cambie de reactivos.

9. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Componentes	Referencias	
	10.521	10.522
Biotoools <i>Pfu</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	100 U	250 U
10X Reaction Buffer MgCl₂ FREE	1.8ml	1.8ml
50 mM MgCl₂ Solution	1.8ml	1.8ml