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 9001:2015 para las siguientes actividades: 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
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 ULTRATOOLS DNA POLYMERASE (1U/µl)

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.221	100 U	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)** 10X Standard Reaction Buffer with $MgCl_2$
10.222	250 U	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)** 10X Standard Reaction Buffer with $MgCl_2$
10.231	100 U	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)** 10X Reaction Buffer $MgCl_2$ FREE
10.232	250 U	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)** 10X Reaction Buffer $MgCl_2$ FREE
10.220BW	BULK	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)**
10.220B	BULK	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1U/µl)** 10X Standard Reaction Buffer with $MgCl_2$
10.230B	BULK	**BIOTOOLS Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)** 10X Reaction Buffer $MgCl_2$ FREE

Almacenar a -20ºC

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 .10 –Junio 2023

1. DESCRIPCIÓN

Biotools Ultratools DNA Polymerase es una ADN polimerasa de *Thermus s.p.*, sometida a un exhaustivo proceso de purificación a fin de reducir el ADN bacteriano procedente del huésped. La enzima es una versión altamente purificada de la Biotools DNA Polymerase. El proceso de purificación minimiza los productos de amplificación inespecíficos y los falsos positivos durante la PCR. La pureza de la proteína y ausencia de ADN contaminante son testados en todos los lotes de enzima producidos (ver Test de Pureza).

La Ultratools DNA Polymerase de Biotools es de aplicación en el diagnóstico clínico para la detección de enfermedades infecciosas y desórdenes genéticos en muestras biológicas.

La Biotools Ultratools DNA Polymerase incluida se suministra a una ***concentración 1 U/µl*** *en el buffer de almacenamiento. Esta concentración facilita el pipeteo sin error de pequeñas cantidades de enzima, de forma que no es necesario realizar diluciones ulteriores.*

Aplicaciones del producto:

- PCR altamente específicas
- PCR de moldes con bajo número de copias
- PCR de moldes bacterianos
- Diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas
- PCR estándar y qPCR

Test de pureza: El control de calidad de los lotes producidos de Ultratools DNA Polymerase, además de evaluar la actividad enzimática, testa la presencia de residuos de ADN bacteriano. En el ensayo se amplifican regiones altamente conservadas del gen ribosomal 16S en ausencia y presencia de molde.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA

Concentración de trabajo ..... 10-40 mU/µl
Índice de extensión: ..... 1 kb/min a 72ºC
Tamaño de amplicones generados: ..... Hasta 5 Kb
Tipo de clonaje: ..... T/A
Actividad endonucleasa:..... No
Actividad reverse transcriptase: ..... No
Actividad 5´→3´exonucleasa:..... Si
Actividad 3´→5´exonucleasa:..... No
Actividad tipo nicking: ..... No

3. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Conservar a **-20ºC** en un congelador que garantice una temperatura constante. En estas condiciones, la enzima será estable hasta la fecha indicada en la etiqueta correspondiente. Evitar la exposición a cambios de temperatura frecuentes.

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 ºC.

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

10X Reaction Buffer- Tris-HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM y $(NH_4)_2SO_4$ 200 mM. El denominado **10X STANDARD REACTION BUFFER with $MgCl_2$ incluye 20 mM de $MgCl_2$** en su composición.

5. CONSIDERACIONES GENERALES

Concentración de Enzima

Biotools Ultratools DNA Polymerase es apta para su uso tanto en aplicaciones de PCR estándar cómo aquellas más especializadas. El rango de concentración recomendada es 10-40 mU/µl de enzima por reacción de amplificación; sólo para aplicaciones específicas o cuando se buscan amplicones largos (>2 kb de ADN genómico) puede ser necesario incrementar la cantidad de enzima en la reacción.

ADN Molde

Tanto la calidad como la cantidad de molde afectan la sensibilidad y 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, fluoróforos, 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 µM, siendo la concentración más usual 200 µM. La concentración de dNTPs puede disminuirse (ej. cuando existen amplificaciones inespecíficas) o aumentarse (ej. 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 $MgCl_2$, pues los dNTPs se comportan como quelantes potentes del catión Mg^{2+}.

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

Concentración de MgCl2

El usuario deberá determinar experimentalmente la concentración óptima de $MgCl_2$ para su ensayo. Nosotros recomendamos comenzar con 1.5-2 mM final como punto de partida. Una concentración elevada de iones Mg^{2+} reduce la fidelidad de copia de la polimerasa y puede inducir la formación de productos de amplificación 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 final de $MgCl_2$ en la reacción.

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 anillen en un amplio rango de temperatura. En la composición del ***Standard Reaction Buffer with MgCl₂***, se incluye iones Mg^{2+} a una concentración final de 2 mM.

Diseño de los Primers

Los primers utilizados en la reacción de amplificación usualmente poseen 15-30 nucleótidos de largo 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 5ºC 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´ de los cebadores puede contener bases desapareadas con el ADN molde, sin embargo no es recomendable que esto ocurra en el extremo 3´.

La cantidad óptima de molde y primers en la PCR deberá ser determinada experimentalmente para cada nueva combinación de molde y primer. La concentración recomendada es 0.1-1.0 µM; la concentración final efectiva se encuentra entre 0.2-0.5 µM. Utilizar 0.2 µM final de c/u para la optimización inicial.

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

Nota 1: *La presencia de residuos de ADN contaminante en los reactivos de PCR puede comprometer severamente los resultados del ensayo; incluso cantidades trazas de ADN contaminante pueden resultar en la obtención de productos de amplificación inespecíficos, aún en ausencia de molde. La utilización de la* ***Biotools Ultratools DNA Polymerase****, es sólo una herramienta para garantizar un nivel bajo de material genético contaminante; para justificar su utilización deberá asegurarse que la totalidad de reactivos y material fungible a utilizar en la reacción de amplificación se encuentren libres de ADN amplificable y que el ensayo se realice en un ambiente carente de contaminación.*

Dividir las áreas de trabajo dedicadas a la manipulación de reactivos, a la manipulación de ADN y a la amplificación. Evitar la contaminación por aerosoles. Utilizar material plástico estéril y libre de nucleasas. Utilizar guantes desechables y batas de laboratorio.

Las condiciones óptimas deben de ser determinadas por el usuario.

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

1. Descongelar y mantener los reactivos en hielo. Una vez descongelados mezclar y centrifugar.

2. Preparar la master mix siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. En cada experimento incluir al menos un control negativo (sin ADN molde).

3. Mezclar la master mix y mantener en hielo. Dispensar el volumen apropiado de master mix en cada vial de reacción.

Tabla 1. Preparación de la Master Mix

COMPONENTE	Concentración Final	50 µl rxn
Master Mix		
Biotools Ultratools DNA Polymerase (1U/µl)	10-40 mU/µl	0.5-2.0 µl
10X Reaction Buffer	1 X	5 µl
50mM $MgCl_2$ Solution*	1.5-4mM	1.5-4 µl
dNTP Mix 10 mM each	200 µM de c/u	1 µl
Primer A	0.1-0.5 µM	x µl
Primer B	0.1-0.5 µM	x µl
Molde de ADN	variable	variable
Agua estéril libre de nucleasas	-	Hasta 50 µl

*No necesario cuando se utiliza 10X Standard Reaction Buffer; este buffer contiene $MgCl_2$.

Continuar en el área de purificación de ADN.

4. Añadir el ADN molde a cada vial de reacción. Cerrar los viales y mezclar suavemente.

Continuar en el área de amplificación o PCR

5. Programar el termociclador según la guía de la Tabla 2 (ver Punto 7). Colocar los viales en el termociclador y ejecutar el programa seleccionado.

Tabla 2. Programa de Amplificación Estándard

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

**Dependiendo del molde de ADN (ver Punto 7).*
***Optimice el tiempo, la temperatura y el número de ciclos de la PCR (ver Punto 7).*

7. GUÍA PARA EL PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Desnaturalización Inicial-La desnaturalización inicial no debe prolongarse más de lo necesario a fin de evitar la inactivación enzimática. Sin embargo, si la desnaturalización del molde es insuficiente, se afectará la eficiencia y el rendimiento de la reacción. Generalmente 3-5 min a 94ºC suele ser suficiente; para moldes con elevado contenido de G+C prolongar esta etapa (≤ 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 94ºC suelen ser suficientes.

Paso de Anillamiento- Para calcular la temperatura óptima de anillamiento se puede emplear un gradiente de temperatura. Comenzar seleccionando una temperatura 5ºC < T_m de los primers; si los primers poseen Tm elevadas, puede escoger un programa de amplificación en dos etapas.

Paso de Extensión-El paso de extensión del ADN molde se realiza a 70-74ºC. El tiempo de esta etapa está en función del tamaño del producto de amplificación esperado, para la *Biotools Ultratools DNA Polymerase* se recomienda 1 min/kb.

Número de Ciclos-El número de ciclos de de amplificación a seleccionar suele ser de 25-35. Este parámetro depende de la concentración del molde en la reacción y del rendimiento esperado. El incremento en el número de ciclos puede generar productos inespecíficos que reducen la eficiencia de la reacción. Determinar experimentalmente el número de ciclos óptimo para cada ensayo.

Paso de Extensión Final-Una vez finalizado el ciclo de amplificación la muestra se debe de incubar a 72ºC durante 5-15 min. Durante esta etapa 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

Ausencia de amplificación o baja eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del ADN.** Corroborar la calidad y cantidad del molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. En caso necesario puede realizarse una extracción orgánica seguida de precipitación con etanol para eliminar inhibidores. Un exceso de ADN puede reducir el rendimiento de la reacción.

   Si el molde presenta una porcentaje elevado de G+C o de estructuras secundarias puede ser necesario adicionar aditivos como el DMSO.
2. **Problema con los primers.** *Diseñar primers* con una temperatura de anillamiento superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers.

   Verificar la *degradación de los primers* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

   Si bien una baja *concentración de primers* puede evitar la formación de dímeros, se requiere una concentración suficiente de cebadores para el correcto rendimiento de la PCR. En caso necesario incrementar la concentración de primers específicos en incrementos de 0.1 µM.
3. **Concentración de enzima inadecuada.** Incrementar en 0.2 U/rxn.
4. **Concentración de $MgCl_2$ insuficiente.** Optimizar la concentración de iones Mg^{2+} entre 1.5-4 mM.
5. **Programación inadecuada de la PCR.**
   Prolongar la *desnaturalización inicial* hasta 8 min.

   Reducir la temperatura de anillamiento con reducciones de 2°C.

   Realizar un número de *ciclos adicionales* en incrementos de 5 ciclos.

   Incrementar el tiempo de extensión en incrementos de 30 seg. Generalmente 60 seg/kb del amplicón suelen ser suficientes.
6. **Error de pipeteo o ausencia de algún componente de reacción.** Repetir la PCR. Verificar las concentraciones y condiciones de almacenamiento de los reactivos.

Productos de amplificación inespecíficos o *smear*

1. **Exceso de molde.** Corroborar la concentración de ADN molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Reducir la cantidad de ADN en la mezcla de reacción.
2. **Ajustar la cantidad de enzima.** Reducir la concentración final de enzima en la reacción, en reducciones de 0.2U.
3. **Optimizar la concentración de $MgCl_2$.** Reducir la concentración de iones magnesio en la reacción.
4. **Problema con los primers.** Corroborar que los primers no se encuentren *degradados* realizando una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

   Diseñar nuevos primers con una Tm superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers.

   Reducir la concentración final de primers en la reacción.
5. **Programa de amplificación inadecuado.**
   Incrementar la temperatura de anillamiento, en incrementos de 2°C.

   Reducir el número de ciclos, en decrementos de 5 ciclos.
6. **Problema de Contaminación.** Si en el control negativo de reacción (sin ADN) observa banda de amplificación o *smear*, repetir en ensayo cambiando los reactivos y siguiendo las instrucciones de la Nota 1.

9. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Componentes	**Referencias**						
	10.221	**10.222**	**10.231**	**10.232**	**10.220BW**	**10.220B**	**10.230B**
Biotools Ultratools DNA Polymerase (1 U/µl)	100 U	250 U	100 U	250 U	Consultar	Consultar	Consultar
10X Standard Reaction Buffer with $MgCl_2$	1.8ml	1.8ml				Consultar	
10X Reaction Buffer $MgCl_2$ FREE			1.8ml	1.8ml			Consultar
50 mM $MgCl_2$ Solution			1.8ml	1.8ml			