



Amplificasa® Certificado de Análisis

Este certificado describe el análisis efectuado al momento de la elaboración del producto.

Descripción del Producto:

Amplificasa® es una ADN polimerasa recombinante proveniente de *Thermus aquaticus*, expresada y purificada en *E. coli*. Amplificasa® es una ADN Polimerasa termoestable compuesta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 94 kD. Amplificasa® es estable en altas temperaturas, lo que la hace ideal en reacciones de amplificación de ADN. La enzima es altamente purificada por cromatografía de intercambio iónico, carece de actividades de ADNasas (endonucleolítica y exonucleolítica), ARNasa y de amplificación inespecífica.

CONTROL DE CALIDAD DE Amplificasa®

Condiciones de ensayo para Amplificasa:

La actividad de la enzima se examina en un volumen final de 20µl poniendo junto los siguientes reactivos:

- 2 µl de buffer de reacción 10X (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH 8.3 y gelatina 10 µg/ml, 15mM de MgCl₂),
- 2 µl de Sol. 10X de Deoxinucleótidos(dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2mM de c/u, 0.2 µl de una Sol. de ADN [10 ng/µl] cadena sencilla de una clona del bacteriófago M13,
- 1 µl de Iniciadores Universales 20X (10 µM de c/u)
- 0.2µl de Amplificasa®, que representa 1 unidad
- H₂O cbp 20 µl.

Las condiciones de amplificación que se usan son: un ciclo (94°C por 1 minuto); 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos) y un ciclo (72°C por 3 minutos). La amplificación se evalúa por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

Actividad de la Enzima

La actividad de cada lote de Amplificasa® es evaluada a través de ensayos de amplificación mediante dilución seriada y comparada con un patrón comercial, la actividad se ajusta a 5 U/µl, asegurando de esta manera que la actividad en todos los lotes producidos sea la misma.

Una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima requerida para incorporar 10 nM de [³²P]dATP en forma insoluble en 30 minutos a 72°C.

Pureza.

La pureza de cada preparación de Amplificasa® es evaluada mediante electroforesis en geles al 10% de poliacrilamida-SDS teñidos con nitrato de plata, la Amplificasa® purificada se observa como una banda única de 94 kD.

Ausencia de Exonucleasas

a) 1 µg de ADN del bacteriófago λ es incubado a 37°C por 16 hrs. con 1 µl (5 unidades) de Amplificasa® en un volumen de 50 µl de Amortiguador de Reacción 1X, y evaluado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN del bacteriófago λ no muestra degradación.

b) 1 µg de ADN cortado con Hae III del bacteriófago λ es incubado a 37°C por 16 hrs. con 1 µl (5 unidades) de Amplificasa® en un volumen de 50 µl de Amortiguador de Reacción 1X y evaluado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La cantidad de enzima probada no da lugar a alteración en el patrón de bandeo del ADN del bacteriófago λ.

Ausencia de Endonucleasas

1 µg de ADN superenrollado de pBR322 es incubado a 37°C por 16 hrs. con 1 µl (5 unidades) de Amplificasa® en un volumen de 50 µl de Amortiguador de Reacción 1X y posteriormente evaluado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración de enzima empleada no ocasiona relajación del ADN plasmídico superenrollado.