

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
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.

HIGH SCRIPTOOLS-QUANTIMIX EASY PROBES MASTER MIX

RT-PCR cuantitativa en un paso

para ser utilizado con sondas de hidrólisis

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10641	100 rxns	High Scriptools Quantimix Easy Probes Master Mix
10642	500 rxns	High Scriptool Quantimix Easy Probes 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. 04 - Marzo 19

1. DESCRIPCIÓN

High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix (High SQEP Master Mix) es un sistema nuevo de RT-PCR en tiempo real para la cuantificación de moldes de ARN utilizando *sondas de hidrólisis* (ej. Sondas TaqMan). La elevada sensibilidad y especificidad de la Master Mixes conseguida por la combinación de Biotools High Retrotranscriptase, Biotools HotSplit DNA Polymerase y un buffer de reacción específico, en un formato fácil de utilizar.

La Master Mix ha sido diseñado para aportar la mayor eficiencia, precisión y sensibilidad en ensayos de RT-PCR cuantitativa. Con este fin, dos enzimas de alto potencial, una retrotranscriptasa termoestable y una ADN polimerasa con actividad *hot start*, son las encargadas de llevar a cabo las dos reacciones de la RT-PCR. La síntesis de ADNc y la PCR ocurren secuencialmente en un tubo único utilizando un buffer de reacción común formulado para garantizar el anillamiento de primers específicos.

El **High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix** proporciona un método rápido y simple que permite la síntesis y amplificación del ADNc en tiempo real, en un mismo tubo. Los reactivos para ambas reacciones se incorporan simultáneamente en el vial de reacción reduciendo el tiempo de manipulación y los riesgos de contaminación sin comprometer la eficiencia o la sensibilidad del ensayo.

La Master Mix ha sido optimizado con ARN de diferentes orígenes incluyendo ARNs virales: ARN del virus de la Hepatitis C, ARN del virus del SIDA, ARN de Beta Actina humana, entre otros.

2. REACTIVOS INCLUIDOS

El sistema contiene reactivos suficientes para un número de reacciones de 25µl y 50 µl .

- **High SQEP Master Mix:** Se trata de una *Master Mix 2X* fácil de utilizar formulada para la optimización de reacciones de RT-PCR en tiempo real en un tubo. El buffer de reacción incluido en la mezcla ha sido adaptado para permitir el análisis cuantitativo de la qRT-PCR utilizando sondas específicas de secuencia. La mezcla incluye: Biotools HotSplit DNA Polymerase, Biotools High *Retrotranscriptase*, dNTPs, MgSO₄, y Buffer de Reacción.
- **DTT 25X Solution:** Es proporcionada en un tubo independiente

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Conservar todos los componentes del *High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix* a -20°C. Los reactivos de la Master Mix deben ser descongelados y manipulados en hielo. Para uso frecuente de la Master Mix se recomienda realizar alícuotas.

- **High SQEP Master Mix:** Mezclar antes de usar.
- **DTT 25X Solution:** Mezclar exhaustivamente antes de usar.

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

4. CONSIDERACIONES GENERALES

Molde: El éxito de la transcripción inversa depende en gran medida de la integridad y pureza del ARN utilizado como molde. Las muestras de ARN deben ser transportadas y conservadas congeladas; si se conservan sin refrigeración el ARN puede degradarse.

Para obtener resultados óptimos el ARN molde debe encontrarse libre de ADN contaminante. Si bien la Biotools HotSplit DNA Polymerase no posee actividad reverso transcriptasa bajo las condiciones de reacción estándares, en determinadas condiciones pueden generarse productos inespecíficos, si las trazas de ADN presentes en la muestra poseen secuencias similares a las del molde.

Si bien los métodos de extracción convencionales generan moldes de calidad suficiente, algunos reactivos utilizados en el proceso (tiocianato de guanidina, fenol, EDTA, detergentes iónicos, partículas de sílice, etc.) pueden interferir en la reacción. Biotools recomienda utilizar el kit Speedtools Total RNA Extraction kit o el kit Speedtools RNA Virus Extraction kit para la extracción de moldes.

Es altamente recomendable cuantificar el ARN mediante espectrometría y utilizar cantidades equivalentes para cada una de las muestras a procesar. Si no conoce la concentración del molde, agregue un volumen de extracción fijo. El ARN purificado debe ser conservado a -20°C o -70°C, en agua libre de RNasas. Las soluciones diluidas de ARN deben ser conservadas en alícuotas y descongeladas una única vez. Para realizar **cuantificación relativa** incluir una muestra de referencia, procesada de la misma manera que los moldes de ARN, y cuantificar por comparación. Para una **cuantificación absoluta** utilizar un ARN de referencia de concentración conocida. A partir de diluciones seriadas del ARN de referencia (procesadas por duplicado o triplicado) trazar una curva estándar y determinar la concentración de los ARNs desconocidos.

La cantidad de ARN necesaria para llevar a cabo la reacción de RT-PCR en tiempo real depende fundamentalmente de la abundancia del ARN de interés. Utilizar como máximo 1µg de ARN por reacción; para estudios de expresión puede comenzar con 100 ng de ARN total.

Concentración de MgSO₄: Los iones magnesio son necesarios para el funcionamiento de las dos enzimas incluidas en la Master Mix: Biotools High Retrotranscriptase y HotSplit DNA Polymerase. La concentración de iones Mg⁺⁺ de 4 mM, concentración proporcionada por la High SQEP Master Mix.

Diseño de Primers y Sondas: Para el éxito de la qRT-PCR es fundamental realizar un buen diseño de primers y sondas, optimizar las concentraciones de utilizar en la reacción, y conservarlas en condiciones apropiadas.

La síntesis de la primera cadena de ADNc deberá utilizarse primers específicos que permitan sintetizar sólo el ADNc de un mensajero particular. Para minimizar el anillamiento inespecífico de primers y sondas es imprescindible realizar un diseño exhaustivo de los primers. A fin de diferenciar entre productos de amplificación procedentes de ADNc y de ADN genómico contaminante se recomienda diseñar primers que anillen parcialmente en dos exones consecutivo; de esta manera se elimina la contaminación con ADNc en la mezcla de reacción.

Independientemente del diseño, la concentración final de primers en la mezcla de reacción deberá ser optimizada experimentalmente; la concentración final óptima suele encontrarse entre 0.4-0.8 µM (la concentración óptima puede variar conforme al termociclador utilizado). En lo que respecta a la concentración de sondas, la óptima suele estar en el rango de 0.1-0.5 µM; utilizar 0.2 µM para la optimización inicial.

Es altamente recomendable que los primers tengan Tm elevadas para poder llevar a cabo la retrotranscripción a una temperatura elevada. Para alcanzar la mayor eficiencia en ensayos de qRT-PCR utilizando sondas específicas de secuencia, los amplicones deben encontrarse entre 100-150 bp y no exceder los 300 bp de largo.

Síntesis de ADNc: Si bien el High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix no requiere una *desnaturalización* previa a la *retrotranscripción*, ésta puede incluirse incubando en un tubo independiente sólo el primer para la síntesis del ADNc y el molde de ARN a 95°C durante 2 min. A continuación incubarse de inmediato en hielo y adicionar al molde los demás componentes de reacción.

La síntesis de ADNc es llevada a cabo por la Biotools *High Retrotranscriptase*. Esta enzima trabaja en un amplio rango de temperatura, entre 40-65°C, lo que permite realizar la retrotranscripción a temperaturas superiores a las habituales minimizando complicaciones ocasionadas por la presencia de estructuras secundarias en el ARN y favoreciendo la síntesis del ADNc *full-length*. La temperatura óptima para el proceso se encuentra entre 45-47°C.

La HotSplit DNA Polymerase permanece inactivada en la mezcla de reacción durante la retrotranscripción; evitando la formación de productos inespecíficos y de dímeros de primer durante el proceso. El incremento de temperatura acontecido durante la desnaturalización inicial activa la polimerasa e inactiva la Biotools High Retrotranscriptase; garantizando la separación temporal de la retrotranscripción y la PCR, y permitiendo la realización de ambas reacciones de manera secuencial en un mismo tubo y sin manipulación intermedia.

Programa de PCR: Realizar la *desnaturalización inicial* a 95°C durante 5-10 min. Durante esta etapa se desnaturalizan los híbridos ARN/ADNc, se inactiva la Biotools High Retrotranscriptase residual, y se activa la Biotools HotSplit DNA Polymerase.

La utilización de primers con Tm elevada permite seleccionar temperaturas de *anillamiento* y de *extensión* superiores, minimizando la unión de primers inespecíficos y la formación de dímeros, e incrementando el rendimiento de los productos de amplificación específicos.

La mayoría de los moldes de ARN pueden ser detectados utilizando 45 ciclos de amplificación. Si el material de partida es escaso se puede incrementar el número de ciclos hasta 60. Durante la etapa de *extensión* utilizar aproximadamente 45-60 seg para amplicones entre 100-250 bp y 90 seg para aquellos >250 bp.

5. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Materiales que deberán ser aportados por el usuario:

- Primers y sondas específicos
- Agua libre de nucleasas

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. Utilizar guantes libres de polvo, material plástico estéril y libre de nucleasas y puntas con filtro.

MANTENER LOS VIALES DE REACCIÓN REFRIGERADOS hasta su introducción en el termociclador. La falta de refrigeración de las mezclas de reacción puede provocar una caída significativa de la sensibilidad.

Incluir ARN de concentración conocida para realizar la curva estándar. La inclusión de controles positivos y negativos (NTC) es altamente recomendable. La High SQEP Master Mix deberá ser utilizada a una concentración final 1X. Esta mezcla funciona para volúmenes de reacción de 25 µl (ver Tabla 1).

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

- 1.-Descongelar y agitar todos los reactivos antes de dispensarlos.
- 2.-Preparar la mezcla de reacción de qRT-PCR en un microtubo estéril de 1.5ml en hielo siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. La mezcla de reacción puede ser utilizada para amplificar ARN moldes, de referencia, controles positivos y NTC. Preparar suficiente mezcla de reacción para el número de reacciones deseado y mantenerla en hielo. PROTEGER LA MEZCLA DE REACTIVOS DE UNA EXPOSICIÓN PROLONGADA A LA LUZ.
- 3.-Dispensar el volumen de mezcla apropiado en los viales de reacción y mantenerlos en hielo. Esta mezcla contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la qRT-PCR, con la excepción del ARN molde.

TABLA 1. Preparación de la mezcla de reacción

COMPONENTE	Concentración Final	25 µl rxn
High SQEP Master Mix	1 X	12.5 µl
DTT 25X Solution	-	1 µl
Primers	0.3-0.8 µM ⁺	x µl
Sondas	0.1-0.5 µM ⁺⁺	x µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 25 µl
ARN Molde	<1µg/rxn	x µl

+ Una concentración final de 0,5 µM suele ser óptima para la mayoría de los ensayos.

++ Una concentración final de 0,2 µM suele ser óptima para la mayoría de los ensayos.

Proceda a trabajar en el área de purificación de ARN separada

Nunca introducir el ARN en la cabina de flujo laminar del área de preparación de reactivos. La reacción debe comenzar en los 10 min posteriores al agregado de los primers y el molde a la mezcla de reacción.

4.-Agregar el ARN molde a los viales de reacción. Cerrar los viales, mezclar su contenido y centrifugar brevemente.

Proceda al área de amplificación

5.-Coloque los viales en el termociclador e inicie el programa de qRT-PCR seleccionado (ver Tabla 2).

TABLA 2. Programa para High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix

STEP	Nº Cycles	Temperature	Time
Desnaturalización*	1	95°C	2 min
Retrotranscripción (síntesis del DNAc)	1	45-47°C	30-45 min
Desnaturalización Inicial, e inactivación de la Biotools High Retrotranscriptase**	1	95°C	5-7 min
Desnaturización Anillamiento y extensión*** (Ver Nota 1)	35-45	94-97°C 58-60°C	15 -30 seg 60 seg ⁺ FAM

* Opcional: Desnaturización de RNA y primer (ver síntesis de ADNc)

** Biotools HotSplit DNA Polymerase es activada durante esta etapa de calentamiento

*** Adquisición de fluorescencia durante las etapas de Anillamiento y Extensión (ver Nota 1)

+ 45-60 seg para amplicones entre 100-250 bp y 90 seg para amplicones > 250 bp.

Nota 1: En caso de aparecer dímeros de primers o productos inespecíficos, incluir un paso adicional de adquisición de fluorescencia después del paso de extensión.

La interpretación de los resultados se realizará con el software específico del equipo siguiendo las instrucciones y recomendaciones del proveedor.

6. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Baja o nula eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del molde.** Verificar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante, y la cantidad por fluorimetría (un exceso de ARN puede reducir el rendimiento de la reacción). El excedente de algunos reactivos de purificación pueden interferir en la reacción: reducir el volumen de molde o cambiar el método de purificación. Asegurarse de que los reactivos, puntas y tubos utilizados sean libres de RNAsas.
2. **Verificar el diseño y las condiciones de almacenamiento de los primers y sondas.** Revisar el diseño de los primers y sondas. Verificar las condiciones de conservación de estos reactivos.
3. **Optimizar la concentración de primers.** Si bien una baja concentración de primers puede prevenir la formación de dímeros, ésta deberá ser suficiente para el correcto rendimiento de la RT-PCR. Incrementar la concentración de los primers en incrementos de 0.1 µM
4. **Optimizar las condiciones de la transcripción inversa.** Moldes poco abundantes, ricos en estructuras secundarias o en G+C pueden requerir mayor tiempo de RT: incrementar hasta 60 min. En caso de incluir una etapa inicial de desnaturalización/anillamiento, incorporar la retrotranscriptasa al finalizar del proceso a fin de evitar su inactivación.
5. **Revisar la programación de la PCR.**
 - Incrementar el tiempo de desnaturalización inicial hasta 10 min. Moldes ricos en G+C o con estructuras secundaria suelen requerir mayor tiempo.
 - Reducir la temperatura de anillamiento en incrementos de 2°C.
 - Incrementar el N° de ciclos en incrementos de 5 ciclos.
 - Incrementar el tiempo de extensión en incrementos de 30 seg.
 - Verificar que la detección de fluorescencia ha sido activada durante la PCR.
 - Seleccionar el filtro apropiado. Asegurarse de haber activado el canal adecuado y que la detección tenga lugar en el paso correcto del programa.
6. **Ausencia de algún componente de reacción.** Verificar los componentes de la reacción y repetir el ensayo.

Productos de amplificación múltiples y/o inespecíficos

1. **Corroborar la calidad y cantidad del molde.** Verificar la integridad y la concentración del ARN. Reducir la cantidad de molde y/o de primers. Si el ARN está contaminado con ADNc, pretratar las muestras con DNasa.
2. **Verificar el diseño y la calidad de los primers.** Diseñar primers con Tm elevada y que no formen horquillas o dímeros de primers. Corroborar que los primers no se encuentren degradados realizando una electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante.
3. **Incrementar la temperatura de la retrotranscripción.** Realizar la síntesis del ADNc a una temperatura superior, incrementar de 1°C.
4. **Condiciones de reacción no óptimas.** Reducir la concentración de primers y sondas.
5. **Revisar la programación de la PCR**
 - Incrementar la temperatura de anillamiento en incrementos de 2°C.
 - Reducir el número de ciclos, en incrementos de 5 ciclos.
 - Incluir un paso adicional de adquisición de fluorescencia (ver Nota 1).
6. **Reducir el tamaño del producto de PCR.** Diseñar primers que permitan obtener amplicones de tamaño entre 100-150 bp (<300 bp).

Falta de linealidad en los valores de Ct

1. **Verificar la calidad y concentración del ARN molde.** La concentración del molde en la mezcla de reacción puede ser muy baja o muy elevada.
2. **Presencia de dímeros de primer.** Ver Nota 1.

Fluorescencia en el control negativo (NTC)

1. **Contaminación de algún reactivo.** Repetir el ensayo con reactivos nuevos.
2. **Presencia de dímeros de primer.** Ver Nota 1.

7. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Tamaño	Referencia
High SQEP Master Mix	1 x 1.4 ml	10641
	5 x 1.4 ml	10642
DTT 25X Solution	1 x 0.1 ml	10641
	5 x 0.1 ml	10642