

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.

BIOTOOLS HIGH RETROTRANSCRIPTASE

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.077	100 rxn	Biotools High Retrotranscriptase
10.078	500 rxn	Biotools High Retrotranscriptase

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 – Febrero 16

1. DESCRIPCIÓN

Biotools High Retrotranscriptase es una nueva transcriptasa reversa recombinante producida en *E. coli*.

Esta enzima carece de actividad RNasa, presenta alta afinidad por el ARN y es activa en un rango amplio de temperatura. Por su estabilidad térmica, la Biotools High Retrotranscriptase puede transcribir moldes de ARN ricos en GC o con elevado porcentaje de estructuras secundaria sin la incorporación de aditivos de reacción.

La Biotools High Retrotranscriptase puede trabajar con diferentes cebadores para la síntesis de ADNc: Oligo (dT) primer, hexámeros *random* o primers específicos.

Esta enzima permite la síntesis de ADNc a temperaturas elevadas (hasta 65°C), y su uso está indicado para ensayos de RT-PCR y qRT-PCR.

Aplicaciones del producto:

- Síntesis de la primera cadena de ADNc para ser utilizado en reacciones de amplificación posteriores: RT-PCR o qRT-PCR.
- En RT-PCR para la amplificación de moldes de ARN complejos: moldes ricos en GC o con un porcentaje elevado de estructuras secundarias.
- Incorporación de nucleótidos modificados con Cy3-, Cy5-, Biotina-, o aminoalil- durante la síntesis de ADNc (ej. hibridación en microarray).

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

- **Biotools High Retrotranscriptase:** Proporcionada en buffer de almacenamiento. **Buffer de almacenamiento:** Tris-Acetato 5 mM (pH 8.0), KCl 15 mM, EDTA 1.5 mM, inhibidores de proteasas y glicerol 50% (v/v).
- **10X High RT Reaction Buffer:** Tris-HCl 100 mM (pH 9.0), KCl 500 mM y DTT 1 mM.
- **100 mM MgSO₄ Solution**

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Conservar el producto a -20°C en un congelador de temperatura constante durante la vida media del producto indicada en la etiqueta correspondiente.

Evitar la exposición a cambios de temperatura frecuentes.

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 molde puede degradarse. Para obtener resultados óptimos el ARN molde debe encontrarse libre de ADN contaminante.

La presencia de residuos de purificación en la muestra (ej. SDS, NaCl, heparina, tiocianato de guanidina) puede interferir con en las reacciones de amplificación del ADNc (RT-PCR o qRT-PCR). Estos inhibidores pueden ser eliminados incluyendo un paso de purificación adicional con etanol seguido de un lavado final con etanol 70%. Nosotros recomendamos utilizar el kit Speedtools Total RNA Extraction kit para la purificación del ARN molde.

Es recomendable cuantificar el molde 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. La cantidad de ARN necesaria para llevar a cabo la síntesis de ADNc depende de la abundancia del ARN de interés, del tipo de molde utilizado (ARN total o ARNm) y del cebador seleccionado. Para estudios de expresión puede comenzar con 100 ng de ARN total (10 ng-5 µg) o entre 1 ng-500 ng de ARNm.

Concentración de MgSO₄: La concentración de MgSO₄ en la reacción debe ser optimizada para cada combinación de molde/primer. Nosotros recomendamos comenzar con una concentración de 3 mM; dependiendo del ensayo la concentración de iones Mg²⁺ puede variar hasta 6 mM. Junto con el kit se proporciona un vial de MgSO₄ 100 mM.

Diseño de Primers: La selección del cebador adecuado para la transcripción inversa puede variar dependiendo de las características del molde de ARN (ej. contenido en GC, presencia de estructuras secundarias, entre otras). Para aplicaciones *in vitro* el primer a utilizar puede ser oligo (dT), que hibrida con la cola poli(A)+ de los ARNm de eucariotas; hexámeros *random*, que hibridan en diferentes puntos a lo largo de la secuencia del molde; o un primer específico que hibrida en una secuencia conocida dentro del ARN.

La concentración final de primers específicos en la mezcla de reacción necesita ser optimizada y suele variar entre 0.1-1 µM; comenzar con 0.5 µM final como punto de partida. Es altamente recomendable que el primer diseñado tenga una Tm elevada para poder llevar a cabo la transcripción inversa a una temperatura entre 45-47°C (temperatura óptima de trabajo de la High Retrotranscriptase).

Para oligo(dT)₁₅ primer recomendamos una concentración final de 1-10 µM en la mezcla de reacción. Los hexámeros *random* que hibridan en diferentes puntos de la secuencia del molde son de gran utilidad para moldes de ARNm largos como para aquellos con un porcentaje elevado de estructuras secundarias. En caso de utilizar hexámeros *random* para la síntesis de ADNc, la proporción de primer y molde deberá seleccionarse en función de la extensión del producto deseado. Para incrementar la longitud del producto de reacción se recomienda utilizar concentraciones bajas de hexámeros. Nosotros recomendamos comenzar con 150-250 ng de hexámeros *random* como punto de partida para la optimización.

Síntesis de ADNc: Si bien la Biotools High Retrotranscriptase no requiere una etapa de *desnaturalización previa a la extensión*, ésta puede incluirse incubando en un tubo independiente sólo el cebador y el molde de ARN a 95°C durante 2 min (o bien 10 min a 65°C). No incubar la enzima a 95°C, ésta puede inactivarse. Una vez finalizado este proceso la mezcla de primer y molde se refrigera hasta alcanzar la temperatura seleccionada para la extensión y se adiciona a la mezcla de reacción.

Temperatura: La Biotools High Retrotranscriptasa es una transcriptasa inversa termoestable que trabaja en un rango amplio de temperatura, entre 40-65°C. Nosotros recomendamos realizar la retrotranscripción a **45-47°C** ya que además de ser la temperatura de trabajo óptima de esta enzima, minimiza complicaciones ocasionadas por la presencia de estructuras secundarias o de un contenido en GC elevado en el molde, y favorece la síntesis del ADNc *full-length*.

La temperatura idónea para la síntesis de ADNc depende no sólo de la transcriptasa inversa sino también de la longitud del ADNc deseado, del contenido en GC del molde de ARN y del cebador seleccionado para llevar a cabo la síntesis. Para transcritos >4kb, incubar durante 60 min a 47°C. Para favorecer la obtención de ADNc *full-length* realizar la transcripción inversa a temperaturas más bajas por períodos de tiempo prolongados (≤60min).

En caso de utilizar *hexámeros random*, es conveniente reducir la temperatura de incubación para favorecer el anillamiento. Para estos cebadores nosotros recomendamos realizar la síntesis de ADNc en dos etapas: 10 min a 25°C seguido de 30 min a 47°C. Para *oligo(dT)₁₅ primer* la temperatura de extensión deberá ser optimizada alrededor de los 47°C.

Cantidad de Biotools High Retrotranscriptase: utilizar entre 0.25-1 µl de enzima por reacción de 20 µl, dependiendo de la cantidad de molde en la reacción. Utilizar aproximadamente 0.5 µl para 1 µg de molde de ARN total.

5. PROTOCOLO PARA LA SÍNTESIS DE ADNc

Materiales que deberán ser aportados por el usuario:

- Cebador
- Mezcla de dNTPs
- Molde de ARN
- Inhibidor de RNasas (opcional)
- Agua libre de nucleasas

A fin de minimizar el riesgo de contaminación con RNasas utilizar guantes libres de polvo, material plástico estéril y libre de nucleasas y puntas con filtro.

1.-Descongelar los reactivos necesarios y mantenerlos en hielo. Realizar una centrifugación rápida antes de su dispensación.

2.-**Opcional:** Preparar la *mezcla de molde/primer* en viales de reacción libres de nucleasas y mantenerlos en hielo (ver instrucciones en Tabla 1).

TABLA 1. Preparación de la mezcla molde/primer

COMPONENTE	Concentración Final	20 µl rxn
ARN Molde	variable*	x µl
Oligo (dT) ₁₅ primer	1-10 µM	x µl
○ Hexámeros <i>Random</i>	150-250 ng	x µl
○ Primer Específico	0.1-1 µM	x µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 15 µl

*10ng-5µg de ARN total ó 1-500ng de ARNm

3.- **Desnaturalización:** Incubar 2 min a 95°C (ó 10 min a 65°C). Enfriar y mantener los viales en hielo.

4.- Preparar la *mezcla de reacción* en un microtubo estéril en hielo siguiendo las instrucciones de la Tabla 2. La mezcla de reacción puede ser utilizada para amplificar moldes de ARN problemas, controles positivos y negativos. Preparar suficiente mezcla para el número de reacciones deseado y mantenerla en hielo.

TABLA 2. Preparación de la mezcla de reacción

COMPONENTE	Concentración Final	20 µl rxn
10X High RT Reaction Buffer	1 X	2 µl
100mM MgSO ₄ Solution*	3 mM	0.6 µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 5 µl
Mezcla de dNTP**	0.2-0.5 mM de c/u	x µl
Biotools High Retrotranscriptase	-	0.5 µl

* Utilizar 3mM como punto de partida

**Nosotros recomendamos 0.5mM de c/u como punto de partida

5.-Dispensar 5 µl de la mezcla preparada en los viales de reacción y mantenerlos en hielo. Evitar la contaminación cruzada durante la dispensación.

6.-Agregar 15 µl de la *mezcla ARN/primer* desnaturalizada para alcanzar un **volumen final de reacción de 20 µl por tubo.**

7.- Cerrar los viales, mezclar su contenido y centrifugar brevemente.

8.-**Extensión:** Incubar a 47°C durante 30 min. Para hexámeros *random* incubar a 25°C durante 10 min y a continuación 30 min a 47°C (ver síntesis de ADNc).

9.-**Inactivación:** Inactivar la Biotools High Retrotranscriptase incubando la mezcla de reacción a 85°C por 5 min.

10.-Colocar los tubos en hielo. En este punto los tubos de reacción pueden almacenarse a 4°C durante 1-2h o bien a -20°C por períodos más prolongados.

11.-Utilizar entre **1-5 µl** del producto de reacción (ADNc) para la amplificación posterior (PCR o qPCR). La cantidad de producto puede ser optimizado

6. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Bajo rendimiento de reacción

1. **Corroborar la cantidad y calidad del molde.** Verificar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante, y la cantidad por fluorimetría. Repurificar el molde de ARN en caso de confirmar su degradación.

-Un **exceso de ARN** puede reducir el rendimiento de la transcripción inversa. Una concentración de molde baja puede incrementar el rendimiento de reacción.

-**Concentración de molde reducida o nula:** Utilizar como molde ARNm poly(A)+ en lugar de ARN total a fin de incrementar la proporción del ARNm de interés.

-**Presencia de inhibidores en la muestra:** Reducir el volumen de molde en la reacción; realizar una etapa de purificación adicional (precipitación con etanol) o cambiar el método de purificación utilizado.

-Asegurarse que los reactivos y el material plástico utilizados sean libres de RNasas.

2. **Contaminación con RNasas.** Proteger el ARN de la degradación por ribonucleasas durante la síntesis del ADNc incluyendo inhibidores de ribonucleasas en la mezcla de reacción. Tener presente que el exceso de algunos inhibidores puede interferir en la RT-PCR. Utilizar material plástico libre de RNasas.

3. **Problemas con los primers.** Verificar el diseño del primer, las condiciones de conservación y la concentración utilizada.

-Verificar que el **primer específico de secuencia** pueda pegarse al ARNm (complementario a la secuencia *downstream* del ARN).

-Rediseñar el primer específico o seleccionar oligo(dT) primer o hexámeros *random* para la síntesis del ADNc.

-**La concentración de primer es muy baja.** Incrementar la concentración en la mezcla de reacción.

-**Problemas con el anillamiento del primer.** En caso de utilizar oligo(dT) primer o hexámeros *random* verificar que la temperatura y el tiempo de incubación seleccionados sean los adecuados.

-Asegurarse que las condiciones de conservación de los primers sean las adecuadas.

4. **Condiciones de reacción no-óptimas.** Optimizar la concentración de MgSO₄, la temperatura y el tiempo de extensión.

-**Moldes de concentración baja, con alto contenido en GC y/o estructuras secundarias** suelen requerir mayor tiempo de extensión: prolongar la incubación hasta 60 min. El rendimiento de reacción puede incrementarse realizando la transcripción inversa a baja temperatura durante un período de tiempo prolongado (≤60 min).

-En caso de incluir una etapa de *desnaturalización* previa a la extensión asegurarse de **no incorporar** la Biotools High Retrotranscriptase durante el proceso.

5. **Optimizar la concentración de enzima.** No utilizar más de 0.5 µl de Biotools High Retrotranscriptase para transcribir 1 µg de ARN total en un volumen de reacción de 20 µl. Para diferentes concentraciones de molde, modificar proporcionalmente la cantidad de enzima en la reacción.

6. **Ausencia de algún componente de reacción.** Incluir en todos los ensayos un control positivo con una combinación de molde/primer previamente evaluada. Verificar los componentes de la reacción y repetir el ensayo.

7. **Programación incorrecta del termociclador.** Verificar que los tiempos y temperaturas programadas sean los adecuados para el ensayo.

7. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Tamaño	Referencia
Biotools High Retrotranscriptase	55 µl	10.077
	280 µl	10.078
10X High RT Reaction Buffer	1.8 ml	10.077
	1.8 ml	10.078
100mM MgSO₄ Solution	1.8 ml	10.077
	1.8 ml	10.078