

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 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 ONESTEP KIT

RT-PCR en un paso

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.071	100 rxn de 50 µl	High Scriptools OneStep Kit
10.073	500 rxn de 50 µl	High Scriptools OneStep Kit

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 06 – Febrero 2016

1. DESCRIPCIÓN

High Scriptools OneStep Kit es un sistema nuevo de RT-PCR para la detección de secuencias específicas a partir de muestras de ARN. Este kit utiliza dos enzimas: High Retrotranscriptase y Biotools HotSplit DNA Polymerase para la detección de moldes de ARN.

El kit ha sido diseñado para aportar la mayor eficiencia y sensibilidad en ensayos de RT-PCR. 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 los primers específicos.

El **High Scriptools OneStep Kit** es un método rápido y simple que permite la síntesis y amplificación del ADNc en un tubo único. Los reactivos para ambas reacciones se incorporan simultáneamente en el mismo vial reduciendo el tiempo de manipulación y los riesgos de contaminación sin comprometer la sensibilidad del ensayo.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

El sistema contiene reactivos suficientes para un número de reacciones de 50µl. El High Scriptools OneStep Kit puede utilizarse para volúmenes finales de reacción de 25 y 50 µl.

- **High Master Mix:** Se trata de una *Master Mix 2X* fácil de utilizar formulada para la optimización de reacciones de RT-PCR en un tubo. La mezcla incluye: Biotools HotSplit DNA Polymerase, dNTPs, MgSO₄ y Buffer de Reacción.
- **High Retrotranscriptase:** Es una nueva retrotranscriptasa que carece de actividad RNasa H, presenta gran afinidad por el ARN y es activa en un amplio rango de temperatura.
- **PCR Astringent:** Se utiliza para incrementar la sensibilidad y especificidad en ensayos de RT-PCR. Su utilización es opcional.
- **100 mM MgSO₄ Solution:** Disponible para ensayos que requieran una concentración de iones magnesio superior a 6mM.

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Conservar todos los componentes del High Scriptools OneStep Kit a -20°C. Los reactivos deben ser descongelados y manipulados en hielo. Para uso frecuente del kit se recomienda realizar alícuotas.

- **High Master Mix:** Mezclar antes de usar.
- **PCR Astringent:** Mezclar antes de usar.
- **MgSO₄ Solution:** Mezclar exhaustivamente antes de usar.

Si el kit 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 condiciones de reacción estándares, en ocasiones pueden generarse productos inespecíficos, si las trazas de ADN presentes en la muestra poseen secuencias similares a las del molde.

La presencia de residuos de purificación en la muestra (ej. SDS, NaCl, heparina, tiocianato de guanidina) puede interferir en la RT-PCR. Biotools recomienda utilizar el kit Speedtools Total RNA Extraction o el kit Speedtools RNA Virus Extraction para la purificación del ARN molde.

Es 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.

La cantidad de ARN necesaria para llevar a cabo la reacción de RT-PCR depende fundamentalmente de la abundancia del ARN de interés. Puede utilizarse 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 de la RT-PCR: High Retrotranscriptase y Biotools HotSplit DNA Polymerase. La concentración de MgSO₄ en la reacción debe ser optimizada para cada combinación de molde/primer.

Biotools recomienda comenzar con una concentración inicial de Mg²⁺ de 6 mM que es la aportada por la *High Master Mix*. Para ciertos ensayos puede requerir una concentración de Mg²⁺ superior (hasta 12 mM). Junto con el kit se proporciona un vial de MgSO₄ 100 mM para suplementar la reacción de RT-PCR cuando sea necesario.

Concentración de PCR Astringent: La incorporación de este aditivo a la mezcla de reacción puede incrementar el rendimiento de productos de PCR específicos, así como reducir los amplicones inespecíficos. La concentración de PCR Astringent deberá ser optimizada experimentalmente; utilizar 2.5 µl (para Vf 25 µl) y 5 µl (para Vf 25 µl) para la optimización inicial.

Diseño de Primers: Para la síntesis de la primera cadena de ADNc deberá utilizarse primers específicos. Los primers específicos sólo permiten sintetizar el ADNc de un mensajero particular. 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 consecutivos.

Independientemente del diseño, la concentración de primers en la mezcla de reacción deberá ser optimizada experimentalmente; la concentración final óptima se encuentra entre 0.1-0.5µM; comenzar con 0.2 µM para la optimización inicial. Es altamente recomendable que los primers tengan Tm altas para poder llevar a cabo la retrotranscripción a una temperatura elevada.

Síntesis de ADNc: Si bien el High Scriptools OneStep Kit no requiere una etapa de *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. Una vez finalizado este proceso la mezcla de primer y molde se adiciona a la mezcla de reacción de la RT-PCR para iniciar la retrotranscripción.

La síntesis de ADNc es llevada a cabo por la *High Retrotranscriptase*, enzima que trabaja en un amplio rango de temperatura, entre 40-65°C. La temperatura recomendada para la retrotranscripción es entre 45-47°C (temperatura óptima para esta enzima) a fin de minimizar las complicaciones ocasionadas por la presencia de estructuras secundarias en el ARN y favorecer la síntesis del ADNc *full-length*.

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 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 productos de amplificación específicos.

La mayoría de los moldes de ARN pueden ser detectados realizando 40 ciclos de amplificación. Si el material de partida es escaso se puede incrementar el número de ciclos hasta 45-55. Durante la etapa de *extensión* utilizar aproximadamente 1 min/kb del producto de amplificación esperado.

5. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Materiales que deberán ser aportados por el usuario:

- Downstream primer
- Upstream primer
- 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 de sensibilidad significativa.

La inclusión de controles positivos y negativos (NTC) es altamente recomendable. La High Master Mix deberá ser utilizada a una concentración final 1X. Esta mezcla funciona para volúmenes de reacción de 25 y 50 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 RT-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, controles positivos y NTC. Preparar suficiente mezcla de reacción para el número de reacciones deseado y mantenerla en hielo.
- 3.-Dispensar el volumen de mezcla apropiado en los viales de reacción y mantenerlos en hielo.

TABLA 1. Preparación de la mezcla de reacción

COMPONENTE	Conc. Final	25 µl rxn	50 µl rxn
High Master Mix 2X	1 X	12.5 µl	25 µl
100 mM MgSO ₄ Solution*	4-12 mM	1-3 µl	2-6 µl
Primers	0.1-0.5 µM	x µl	x µl
PCR Astringent**	-	1-5 µl	2-10 µl
High Retrotranscriptase	-	0.25 µl	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 25 µl	Hasta 50 µl
ARN	Máximo 1µg/rxn	x µl	x µl

*Sólo necesario para concentraciones de MgSO₄ >6mM

**La inclusión de PCR Astringent es opcional. Utilizar para la optimización inicial 2.5 y 5 µL para Vf de 25 y 50 µL, respectivamente

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.-Colocar los viales en el termociclador y programar (ver Tabla 2).

Análisis

6.-Analizar los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando un 10% de la reacción total. Visualizar las bandas mediante tinción con bromuro de etidio u otro intercalante fluorescente.

7- Almacenar los productos de reacción a -20°C hasta su utilización.

TABLA 2. Programa para High Scriptools OneStep kit

ETAPA	Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización*	1	95°C	2 min
Retrotranscripción (síntesis de ADNc)	1	45-47°C	30-60 min
Desnaturalización Inicial, e inactivación de la retrotranscriptasa**	1	95°C	5-10 min
Desnaturalización	40-50	95°C	10-30 seg
Anillamiento		2-5°C<Tm de primers	5-20 seg
Extensión		60-72°C	45-60 seg
Extensión final	1	72°C	2-5 min
Enfriamiento	∞	15°C	∞

* Opcional: desnaturalización de ARN y primer (ver síntesis de ADNc)

** La Biotools HotSplit DNA Polymerase es activada durante esta etapa

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 del molde por fluorimetría (un exceso de ARN puede reducir el rendimiento).

El excedente de algunos reactivos de purificación pueden interferir en la RT-PCR: 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.** Verificar que el primer *downstream* sea complementario a la secuencia del ARN *downstream*. Diseñar primers que tengan una Tm elevada y que no formen horquillas o dímeros de primers. Verificar sus condiciones de conservación.

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. **Condiciones de reacción no-óptimas.**

-Optimizar la concentración de MgSO₄ realizando un gradiente de concentración.

-Reducir la concentración de PCR Astringent.

5. **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.

6. **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.

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

8. **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 gADN, pre-tratar 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 a 1°C.

4. **Condiciones de reacción no óptimas.**

-Incrementar la concentración de PCR Astringent

-Reducir la concentración de primers

-Optimizar la concentración de MgSO₄

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.

6. **Contaminación de algún reactivo.** Si aparece banda en el control negativo, repetir el ensayo con reactivos nuevos.

7. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

DESCRIPCIÓN	Tamaño	Referencia
High Retrotranscriptase	55 µl	10.071
	5 x 55 µl	10.073
High Master Mix	2.8 ml	10.071
	5 x 2.8 ml	10.073
PCR Astringent	1.2 ml	10.071
	5 x 1.2 ml	10.073
100mM MgSO₄ Solution	1.8 ml	10.071
	1.8 ml	10.073