

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 KIT

RT-PCR cuantitativa en un paso para ser utilizado con fluoróforos intercalantes

REF.	FORMATO	CONTENIDO
10.621	100 rxn de 50µl	High Scriptools-Quantimix Easy Kit
10.623	500 rxn de 50µl	High Scriptools-Quantimix Easy 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. 07 – Febrero 16

1. DESCRIPCIÓN

High Scriptools-Quantimix Easy Kit es un sistema nuevo de RT-PCR en tiempo real para la cuantificación de secuencias específicas a partir de muestras de ARN. Este kit utiliza dos enzimas: High SQ Retrotranscriptase y Biotools HotSplit DNA Polymerase para la cuantificación de moldes de ARN.

El kit ha sido diseñado para aportar la mayor eficiencia y sensibilidad en ensayos de RT-PCR cuantitativa utilizando fluoróforos intercalantes. 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.

La señal de fluorescencia generada por la incorporación del fluoróforo intercalante al ADN es monitorizada al final de cada ciclo de amplificación.

El **High Scriptools-Quantimix Easy Kit** es un método rápido y simple que permite la síntesis y amplificación del ADNc en tiempo real, en un tubo único. 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.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

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

- **High SQ Master Mix:** Se trata de una *Master Mix* 2X fácil de utilizar formulada para la optimización de reacciones de qRT-PCR en un tubo. La mezcla incluye: Biotools HotSplit DNA Polymerase, dNTPs, MgSO₄, y Buffer de Reacción.
- **High SQ 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.
- **qPCR Astringent:** Se utiliza para incrementar la sensibilidad y especificidad en ensayos de qRT-PCR. Su utilización es opcional.
- **100 mM MgSO₄ Solution:** Utilizado para ensayos que requieran una concentración de iones magnesio superior a 6mM.

El fluoróforo intercalante no se proporciona con el kit

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

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

- **High SQ Master Mix:** Mezclar antes de usar.
- **qPCR 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 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 las diferentes muestras a procesar. Si no conoce la concentración, agregue un volumen de extracción fijo. Para realizar **cuantificación relativa** incluir una muestra de referencia, procesada de la misma manera que los moldes, y cuantificar por comparación. Para una **cuantificación absoluta** utilizar un ARN de referencia de concentración conocida; a partir de diluciones seriadas del mismo (procesadas por duplicado o triplicado) trazar una curva estándar y determinar la concentración de los ARN 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. 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 SQ Retrotranscriptase y Biotools HotSplit DNA Polymerase. La concentración de MgSO₄ en la reacción debe ser optimizada para cada combinación de molde/primer. Si bien la concentración final de sulfato de magnesio en la reacción puede variar entre 4-12 mM, se recomienda seleccionar experimentalmente la concentración óptima a fin de mejorar la sensibilidad, especificidad y calidad del ensayo.

La High SQ Master Mix posee MgSO₄ en su composición; el contenido de iones magnesio aportado por esta mezcla es de 6mM final. En el kit se proporciona un vial de MgSO₄ 100 mM, a utilizarse en caso de requerir optimización adicional.

Concentración de qPCR 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 qPCR Astringent deberá ser optimizada experimentalmente; utilizar para la optimización inicial 5 µl para V_i de reacción de 25 µl ó 10 µl para V_i de 50 µl.

Diseño de Primers: Para la síntesis de la primera cadena de ADNc deberá utilizarse primers específicos, que 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 reacción deberá ser optimizada experimentalmente; la concentración óptima suele encontrarse entre 0.1-0.5µM; comenzar con 0.2 µM para la optimización inicial.

Es altamente recomendable que los primers tengan una T_m elevada para llevar a cabo la retrotranscripción a temperaturas elevadas.

Síntesis de ADNc: Si bien el High Scriptools-Quantimix Easy 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 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 *High SQ Retrotranscriptase*. Esta enzima trabaja en un amplio rango 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*.

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 SQ 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 *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 45-60 seg para amplicones entre 100-250 bp y 90 seg para aquellos >250 bp.

La inclusión de una *curva de melting* es primordial en experimentos con fluoróforos intercalantes a fin de evaluar el perfil de *melting* de los productos de PCR. Tener en cuenta que la inclusión de qPCR Astringent en la mezcla de reacción modifica la temperatura de *melting* de los amplicones.

5. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Materiales que deberán ser aportados por el usuario:

- Fluoróforo intercalante
- 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 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 SQ 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 los reactivos antes de dispensarlos.
- 2.-**Diluir el fluoróforo.** Antes de utilizar el fluorocromo es necesario realizar una dilución de la solución stock de fluoróforo siguiendo las instrucciones del fabricante. Proteger el fluorocromo de una exposición prolongada a la luz.
- 3.-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 negativos. 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.**
- 4.-Dispensar el volumen de mezcla apropiado en los viales de reacción y mantenerlos en hielo.

TABLA 1. Preparación de la mezcla de reacción

COMPONENTE	Concentración Final	25 µl rxn	50 µl rxn
High SQ Master Mix 2X	1 X	12.5 µl	25 µl
100 mM MgSO ₄ Solution*	4-12 mM	x µl	x µl
Primers	0.1-0.5 µM	x µl	x µl
qPCR Astringent**	-	2.5-6.0 µl	5-12 µl
SYBR® Green I (1/1000)*	0.1-0.5 X	0.25-1.25 µl	0.5-2.5 µl
High SQ Retrotranscriptase	-	0.25 µl	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 25 µl	Hasta 50 µl
ARN molde	<1µg/rxn	x µl	x µl

* Sólo necesario para concentraciones de MgSO₄ >6mM

**La inclusión de qPCR Astringent es opcional

* Utilizar para la optimización inicial 0.5 µl (para V_i 25µl) y 1.0 µl (para V_i 50µl)

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.

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

Proceda al área de amplificación

6.-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 kit

ETAPA	Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización*	1	95°C	2 min
Retrotranscripción (síntesis de ADNc)	1	45-47°C	30-40 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* (Ver Nota 1)		60-72°C	45-60 seg
Melting	1	60-95°C	Melting estándar o programada**

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

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

* El excedente de fluorescencia durante la etapa de Extensión.

** En melting programada, comenzar con una rampa de 0.5 °C/seg

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 RT-PCR: reducir el volumen de molde o cambiar el método de purificación. Asegurarse 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. **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. **Condiciones de reacción no-óptimas.**
-Incrementar la concentración del fluoróforo intercalante.
-Optimizar la concentración de MgSO₄ realizando un gradiente de concentración.
6. **Revisar la programación de la PCR.**
-Incrementar el tiempo de desnaturalización inicial hasta 10 min. Moldes ricos en G+C o con estructuras secundarias 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.
-Seleccionar un filtro compatible con el fluoróforo utilizado. Corroborar que la lectura de la fluorescencia se realice en el canal específico y en el paso adecuado del programa.
7. **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 ADNg, pretratar las muestras con DNasa I.
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 qPCR Astringent y/o reducir la concentración de primers.
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 100-250 bp (<500 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 SQ Retrotranscriptase	55 µl	10.621
	5 x 55 µl	10.623
High SQ Master Mix	2.8 ml	10.621
	5 x 2.8 ml	10.623
qPCR Astringent	1.2 ml	10.621
	5 x 1.2 ml	10.623
100mM MgSO₄ Solution	1.8 ml	10.621
	1.8 ml	10.623