

## 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](mailto:info@biotools.eu)  
[www.biotools.eu](http://www.biotools.eu)



**BIOTOOLS**  
BIOTOOLS B & M LABS. S.A.

## HIGH SCRIPTOOLS-QUANTIMIX EASY MASTER MIX

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

| REF.  | FORMATO  | CONTENIDO                                 |
|-------|----------|---|
| 10611 | 100 rxns | High Scriptools-Quantimix Easy Master Mix |
| 10612 | 500 rxns | High Scriptools-Quantimix Easy 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 Master Mix (High SQE Master Mix)** es un sistema nuevo de RT-PCR en tiempo real para la cuantificación de secuencias específicas a partir de muestras de ARN. Esta Master Mix utiliza dos enzimas: Biotools High Retrotranscriptase y Biotools HotSplit DNA Polymerase para la cuantificación de moldes de ARN.

La Master Mix ha sido diseñada 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 Master Mix** 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

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

- **High SQE 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, Biotools High Retrotranscriptase, dNTPs, MgSO<sub>4</sub>, y Buffer de Reacción.
- **DTT 25X Solution:** Es proporcionada en un tubo independiente.
- **qPCR Astringent:** Se utiliza para incrementar la sensibilidad y especificidad en ensayos de qRT-PCR.
- **SYBR® Green I:** fluoróforo intercalante.

## 3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Conservar todos los componentes del *High Scriptools-Quantimix Easy Master Mix* a -20°C, excepto el SYBR Green que debe almacenarse a 4° 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 SQE Master Mix:** Mezclar antes de usar.
- **DTT 25X Solution:** Mezclar exhaustivamente antes de usar.
- **qPCR Astringent:** Mezclar antes de usar.
- **SYBR® Green I:** Al recepcionar el fluoróforo, mantener la alícuota de solución stock de SYBR® Green I a -20°C en el tubo opaco. Al usar, agregarle 500 µl de agua libre de nucleasas y mezclar (la dilución 1/1000 es estable durante 1 mes a 4°C, NO CONGELAR).

## 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 MgSO<sub>4</sub>:** 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<sup>2+</sup> de 4 mM, concentración proporcionada por la High SQE Master Mix 2X.

**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 2,5 µl para V<sub>i</sub> de reacción de 25 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 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 una T<sub>m</sub> elevada para llevar a cabo la retrotranscripción a temperaturas elevadas.

**Síntesis de ADNc:** Si bien el High Scriptools-Quantimix Easy Master Mix 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 incubará 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. 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 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 *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:**

- 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 SQE 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 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   |
|---------------------------|---------------------|-------------|
| High SQE Master Mix       | 1 X                 | 12.5 µl     |
| DTT 25X Solution          | -                   | 1 µl        |
| Primers                   | 0.4-0.8 µM          | x µl        |
| qPCR Astringent           | -                   | 2.5 µl      |
| SYG (1/1000) <sup>†</sup> | -                   | 0.8-1.3 µl  |
| Agua libre de nucleasas   | -                   | Hasta 25 µl |
| ARN molde                 | <1µg/rxn            | x µl        |

<sup>†</sup> Utilizar para la optimización inicial 1.0 µl (para V<sub>i</sub> 25µl)

**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 Master Mix**

| ETAPA  | Nº Ciclos | Temperatura  | Tiempo   |
|--|-----------|--|--|
| <b>Desnaturalización*</b>  | 1         | 95°C   | 2 min  |
| <b>Retrotranscripción</b><br>(síntesis de ADNc)                              | 1         | 45-47°C  | 30-40 min  |
| <b>Desnaturalización Inicial</b> , e inactivación de la retrotranscriptasa** | 1         | 95°C   | 5-10 min   |
| Desnaturalización<br>Anillamiento<br>Extensión* (Ver Nota 1)                 | 40-50     | 95°C<br>2-5°C<T <sub>m</sub> de primers<br>60-72°C<br>84°C | 10-30 seg<br>5-20 seg<br>45-60 seg<br>10 seg (FAM) |
| <b>Melting</b>   | 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

\* Adquisición 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 T<sub>m</sub> 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 el proceso a fin de evitar su inactivación.
5. **Condiciones de reacción no-óptimas.**  
-Incrementar la concentración del fluoróforo intercalante.
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.  
-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 T<sub>m</sub> 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.

## 7. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

| DESCRIPCION                | TAMAÑO     | Referencia |
|----------------------------|------------|------------|
| <b>High SQE Master Mix</b> | 1 x 1.4 ml | 10611      |
|                            | 5 x 1.4 ml | 10612      |
| <b>DTT 25X Solution</b>    | 1 x 0.1 ml | 10611      |
|                            | 5 x 0,1 ml | 10612      |
| <b>qPCR Astringent</b>     | 1 x 270 µl | 10611      |
|                            | 5 x 270 µl | 10612      |
| <b>SYG</b>                 | 1 x 0,5 µl | 10611      |
|                            | 2 x 0,5 µl | 10612      |