

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 devuelto 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



QUANTIMIX EASY PROBES KIT

Kit para amplificación y cuantificación de ADN en tiempo real utilizando sondas fluorescentes específicas

| Ref. | FORMATO | CONTENIDO |
|---------|----------|-------------------------------|
| 10.600M | 20 rxn | Quantimix Easy Probes Kit |
| 10.601 | 100 rxn | Quantimix Easy Probes Kit |
| 10.602 | 200 rxn | Quantimix Easy Probes Kit |
| 10.603 | 500 rxn | Quantimix Easy Probes Kit |
| 10.604 | 1000 rxn | Quantimix Easy Probes Kit |
| 10.650M | 20 rxn | Quantimix Easy Probes-ROX Kit |
| 10.651 | 100 rxn | Quantimix Easy Probes-ROX Kit |
| 10.652 | 200 rxn | Quantimix Easy Probes-ROX Kit |
| 10.653 | 500 rxn | Quantimix Easy Probes-ROX Kit |
| 10.654 | 1000 rxn | Quantimix Easy Probes-ROX 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. 08 – Marzo 2017

1. DESCRIPCIÓN

QUANTIMIX EASY PROBES KIT ha sido optimizado para conseguir la máxima eficiencia y sensibilidad en reacciones de amplificación en tiempo real utilizando sonda(s) fluorescentes específicas para la detección y cuantificación del ADN molde. Este kit es compatible con sondas de hidrólisis (ej. Taqman®; ZEN™ *double-quenched probes*) y sondas *hairpin* (ej. Scorpion®).

En el **QUANTIMIX EASY PROBES Kit** la señal fluorescente es generada por la sonda específica incluida en la reacción. En la fase exponencial del proceso de amplificación existe una correlación entre el producto generado y el ADN molde; siendo el nivel de fluorescencia proporcional al producto amplificado en cada ciclo.

Alguna de las variantes del kit incluyen el fluorocromo de Referencia ROX™ que permite normalizar las diferencias de señal fluorescente originadas por artefactos como errores de pipeteo o limitaciones propias de ciertos termocicladores (ej. termocicladores de bloque). El uso del fluorocromo de referencia está especialmente indicado para los termocicladores de tiempo real de las firmas Applied Biosystems (ABI) y Stratagene. La inclusión de ROX™ es opcional, por lo cual éste se provee en un vial independiente.

QUANTIMIX EASY PROBES KIT es una *Master Mix 2X* (QUANTIPROBES), que contiene Biotools DNA polimerase, los cuatro dNTPs, MgCl₂ y Buffer de Reacción, su utilización facilita la manipulación reduciendo tanto el tiempo de operación como las etapas de pipeteo. El QUANTIPROBES incluye todos los componentes de reacción, excepto el ADN, los primers y la sonda específica de secuencia.

Este kit es compatible con termocicladores en tiempo real que utilizan tubos de reacción estándar, así como aquellos que utilizan capilares.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

- **QUANTIPROBES:** Es una solución 2X lista para su uso que contiene todos los componentes para llevar a cabo la amplificación en tiempo real: Biotools DNA Polymerase, dNTPs, Buffer de Reacción, y el MgCl₂ a la concentración apropiada.
- **50 mM MgCl₂ Solution:** Su uso sólo está indicado para reacciones de amplificación específicas que requieran optimización adicional.
- **ROX™ DYE:** Disponible en algunas referencias. Este fluorocromo se provee a una concentración 50X.

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Almacenar todos los componentes del QUANTIPROBES EASY SYG Kit a **-20°C** en un congelador que garantice una temperatura constante (no se recomiendan congeladores *frost-free*). Todos los reactivos deben ser descongelados y manipulados en hielo. Para uso frecuente del kit se recomienda realizar alícuotas a fin de evitar ciclos frecuentes de congelamiento/descongelamiento.

- **QUANTIPROBES:** Mezclar antes de usar.
- **MgCl₂ Solution:** Mezclar exhaustivamente antes de usar.
- **ROX™ DYE:** Conservar en la **oscuridad** y a una temperatura de **-20°C** o de **4°C**. El almacenamiento a 4°C evita la descongelación previa a su utilización

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

4. CONSIDERACIONES GENERALES

Molde: La integridad y pureza del ADN molde es clave para la obtención de resultados óptimos en la reacción de amplificación en tiempo real. Si bien el ADN purificado por los métodos estándares suele resultar adecuado para su amplificación en tiempo real, numerosos componentes como detergentes iónicos, colorantes, fenol/cloroformo, sales, EDTA y otros solventes químicos, pueden inhibir la reacción de amplificación e interferir con la detección de la señal fluorescente. Se recomienda transportar las muestras de ADN en frío ya que la falta de refrigeración puede degradar el ADN.

En caso de utilizar métodos con matriz de sílice para la purificación del molde asegurarse de eliminar completamente las partículas de sílice en la muestra ya que ésta inhibe la amplificación y la lectura de fluorescencia. Biotools recomienda su línea de productos Speedtools para la extracción y purificación de ADN a partir de sangre (*Speedtools DNA Extraction Kit*), de tejido (*Speedtools Tissue DNA Extraction Kit*), de comida (*Speedtools Food DNA Extraction Kit*) y de plantas (*Speedtools Plant DNA Extraction Kit*).

La cantidad de ADN a agregar en la reacción dependerá del origen y de la calidad del molde a utilizar. Si no conoce la concentración del molde, agregue un volumen de extracción fijo. Por la elevada sensibilidad de la qPCR muy pocas copias del ADN molde suelen ser suficientes para iniciar la amplificación. A fin de minimizar la presencia de inhibidores en la muestra, se recomienda comenzar la optimización con la cantidad de molde mínima necesaria para conseguir una cuantificación eficiente.

Concentración de MgCl₂: Concentraciones elevadas de MgCl₂ pueden dar lugar a la formación de productos inespecíficos y baja fidelidad de copia; en tanto que una concentración insuficiente puede reducir el rendimiento de la reacción. El rango de concentración recomendado es de 3-6 mM. La concentración final de MgCl₂ en la mezcla de reacción, aportada por el QUANTIPROBES, es de 4 mM, concentración óptima para la mayoría de los ensayos. No obstante, el kit contiene un vial de MgCl₂ 50 mM para optimizar su concentración en caso de ser necesario.

Concentración de ROX™: La concentración óptima del fluorocromo de referencia varía con el termociclador. Los instrumentos que poseen filtros optimizados suelen requerir menos concentración de fluorocromo. Biotools recomienda 1X de la solución provista. Para más detalles seguir las instrucciones específicas de su termociclador.

Diseño de Primers: El diseño correcto de los primers es crucial para el éxito de la qPCR. Los primers utilizados en la reacción de amplificación poseen usualmente un tamaño de 15-30 nucleótidos con un contenido en G+C de 40-60%. Para evitar la formación de dímeros de primer o de horquillas, los primers no deben de ser complementarios consigo mismos o con otros primers presentes en la reacción. El extremo 5' del primer puede contener bases desapareadas con el ADN molde, sin embargo no es recomendable que esto ocurra en el extremo 3'.

Al diseñar los primers tener en cuenta que los amplicones para PCR en tiempo real suelen tener un tamaño inferior que los de productos de PCR convencionales, usualmente menos de 500 bp. Los mejores resultados de PCR en tiempo real suelen obtenerse con productos de amplificación entre 75-150 bp.

A fin de reducir el tiempo de ciclado, se aconseja seleccionar primers con una Tm próxima a 60 °C y utilizar programas de 2-pasos, en lugar de 3-pasos.

La concentración de primers recomendada es de 0.1-0.9 µM

En lo que respecta a la **concentración de sonda**, si bien depende del tipo de sonda utilizada, por lo general la concentración recomendada se encuentra en el rango de 0.1-0.5 µM (0.2 µM suele resultar la concentración óptima para la mayoría de los ensayos).

Programa de PCR: Ciertos parámetros de la programación afectan tanto la especificidad como la eficiencia de la amplificación. Estos parámetros incluyen la temperatura y el tiempo de desnaturalización, anillamiento y elongación; velocidad de las rampas; y número de ciclos.

Debido al pequeño tamaño de los amplicones de la PCR en tiempo real, los programas de ciclado suelen ser más cortos que los de la PCR convencional.

La temperatura de anillamiento de los primers debe de ser similar con un máximo de 5 °C de diferencia entre ellos. Una temperatura de anillamiento baja incrementa el riesgo de dímeros de primers y/o productos de amplificación inespecíficos.

El QUANTIMIX EASY PROBES kit contiene una polimerasa con una baja tasa de error la cual requiere un tiempo de extensión superior que el de otras polimerasas.

5. PROTOCOLO ESTÁNDAR

Materiales que deberán ser aportados por el usuario:

- Sonda fluorescente específica
- Primers específicos
- Agua libre de nucleasas
- ADN molde, control positivo para la curva estándar

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.

MANTENER REFRIGERADOS LOS TUBOS DE REACCIÓN hasta su introducción en el termociclador. En caso de trabajar con viales estándares, asegúrese de mantenerlos en hielo o en bloques refrigerados evitando que se mojen las tapas. Si se utilizan tubos capilares, el bloque refrigerante debe refrigerarse durante al menos 4 horas previas a su utilización.

Trabaje en el área de preparación de reactivos en una cabina de flujo laminar. A fin de evitar contaminaciones o falsos negativos utilice guantes y material plástico libre de nucleasas, y puntas de pipeta con filtro.

- 1.- Descongelar y mezclar cuidadosamente los reactivos antes de su dispensación.
- 2.- Si el ensayo es cuantitativo deberán incluirse estándares de concentración conocida para realizar una curva patrón. Se recomienda incluir al menos un control positivo y uno negativo por cada experimento a realizar.
- 3.- Prepare la *master mix* siguiendo las instrucciones de la TABLA 1. EVITAR UNA EXPOSICIÓN PROLONGADA DE LA MASTER MIX A LA LUZ.
- 4.- Cuando lo requiera incluya el fluorocromo de referencia (ROX™) en la *master mix*. Conservar los tubos de ROX™ en la oscuridad.

TABLA 1. Preparación de la Master Mix

| COMPONENTE | Concentración Final | 20 µl rxn |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| 2X QUANTIPROBES | 1 X | 10 µl |
| 50 mM MgCl ₂ Solution* | 4-6 mM | x µl |
| Primers | 0.1-0.9 µM | x µl |
| Sonda(s) | 0.1-0.3 µM | x µl |
| BSA ¹ | 0.5 mg/ml | x µl |
| ROX™ Dye | 1X | 0,4 µl |
| Agua libre de nucleasas | - | Hasta 20 µl |
| ADN molde | variable | x µl |

*Sólo necesario para concentraciones de MgCl₂ >4mM

¹Biotoools recomienda la incorporación de albúmina sérica bovina (BSA) en los ensayos de amplificación en tiempo real realizados en los tubos capilares de cristal para el termociclador Roche LightCycler

Proceda a trabajar en el área de purificación de ADN separada de otras fuentes de ADN.

Nunca introducir el ADN en la cabina de flujo laminar del área de preparación de reactivos. Es conveniente que la amplificación comience en un plazo máximo de 10 minutos desde que se incorpora el ADN y los primers a la mezcla de amplificación. Colocar todos los reactivos en hielo hasta su introducción en el termociclador.

5.- Añada el ADN molde a cada vial de reacción. Cierre los viales, mezcle cuidadosamente (no utilizar vortex) y centrifugue brevemente antes de iniciar el ciclado.

Proceda al área de amplificación o PCR

6.- Programe el termociclador. En la Tabla 2 recomendamos un programa de 3-etapas y otro de 2-etapas según la T_m de los primers sea <60°C o ≥60°C, respectivamente. Los parámetros del ciclado recomendados son sólo una guía y podrán ser modificados en función de las características de cada ensayo.

TABLA 2. Programa de PCR para QUANTIMIX EASY PROBES Kit

A) Programa de Amplificación en 3-Pasos (para primers con T_m < 60°C)

| PASOS | Nº de Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|--------------|------------------------------------|------------------------------|
| Desnaturalización Inicial | 1 | 95-98°C | 2-5 min |
| Desnaturalización | 30-50 | 95-98°C | 5-10 seg |
| Anillamiento | | 2-5 °C □ T _m de primers | 5-10 seg |
| Extensión* | | 60-65°C | 20-60 seg (20 seg/100 bp) |

*Lectura de fluorescencia en el paso de Extensión

B) Programa de Amplificación en 2-Pasos (para primers con T_m ≥60°C)

| PASOS | Nº de Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|---------------------------|--------------|-------------|----------|
| Desnaturalización Inicial | 1 | 95-98°C | 2-5 min |
| Desnaturalización | 30-50 | 95-98°C | 5-10 seg |
| Anillamiento/Extensión* | | 60°C | 60 seg |

*Lectura de fluorescencia en el paso de Anillamiento/Extensión

Nota: En caso de utilizar ROX™ Dye, la lectura de fluorescencia se realiza simultáneamente para el fluoróforo específico y ROX™ Dye en el canal adecuado.

7.- Coloque los tubos en el termociclador e inicie el ciclado.

Este protocolo ha sido optimizado para los siguientes equipos de tiempo real: LightCycler (Roche), iCycler (Biorad), SmartCycler I y II (Cepheid), Rotor-Gene 3000 y 6000 (Corbett Research) y ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Para otros termocicladores puede ser necesario optimizar los parámetros de la reacción. Ante cualquier duda, contacte con nuestro Departamento Técnico (info@biotoools.eu).

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

6. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Ausencia de amplificación o baja eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del ADN.** Corroborar la calidad y cantidad del molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. En caso necesario realizar una extracción orgánica seguida de precipitación con etanol para eliminar inhibidores de la amplificación. Un exceso de molde puede reducir el rendimiento de la reacción.
2. **Rediseñar los primers.** Diseñar primers con una temperatura de anillamiento superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers.
3. **Optimizar la concentración de primers.** Si bien una baja concentración de primers puede evitar la formación de dímeros, una concentración suficiente de los mismos es necesaria para el correcto rendimiento de la PCR. En caso necesario incrementar la concentración de los primers específicos en incrementos de 0.1 µM.
4. **Asegurarse que la sonda fluorescente sea específica para el molde a amplificar.** Revisar, además la concentración de la sonda incorporada en la reacción.
5. **Reducir el tamaño del producto de PCR.** Diseñar nuevos primers que permitan obtener productos de PCR de tamaño entre 75-150 bp.
6. **Incrementar el tiempo de desnaturalización inicial.** Ampliar el tiempo de desnaturalización inicial, especialmente si su molde presenta estructuras secundarias o alto contenido en G+C (no más de 7 min).
7. **Reducir la temperatura de anillamiento.** Reducir la temperatura de anillamiento en incrementos de 2°C.
8. **Incrementar el número de ciclos.** Incorporar más ciclos en el programa de amplificación en incrementos de 5 ciclos.
9. **Ampliar el tiempo de extensión.** Incrementar el tiempo de extensión en incrementos de 30 segundos. Usualmente, 20 seg/100 bp de producto de PCR suelen ser suficientes.
10. **Corroborar la programación de la etapa de detección.** Confirmar que la etapa de detección de fluorescencia ha sido activada y que la misma tenga lugar en el paso adecuado del programa de amplificación.
11. **Seleccionar un filtro apropiado.** Para termocicladores de tiempo real que posean múltiples canales de detección, corroborar que el filtro activado es compatible con el marcaje de su sonda.

Productos de amplificación inespecíficos

1. **Reducir la concentración de los componentes de reacción.** Corroborar la concentración de ADN molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Reducir la cantidad de molde, de primers y/o sonda en la mezcla de reacción.
2. **Corroborar el estado de los primers.** Corroborar que los primers no se encuentren degradados realizando una electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante.
3. **Rediseñar los primers.** Diseñar primers con una T_m superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers.
4. **Asegurarse que la sonda fluorescente sea específica para el molde a amplificar.**
5. **Optimizar la concentración de sonda.** Corroborar las condiciones de reacción recomendadas para su sonda fluorescente específica.
6. **Incrementar la temperatura de anillamiento.** Utilizar temperaturas de anillamiento superiores, en incrementos de 2°C.
7. **Reducir el número de ciclos.** Disminuir el número de ciclos del programa de amplificación, en incrementos de 5 ciclos.