

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 HOTSPLIT PROBES KIT

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

(Incluye Biotools HotSplit DNA Polymerase)

Ref.	FORMATO	CONTENIDO
10.680M	20 rxn	Quantimix HotSplit Probes Kit
10.681	100 rxn	Quantimix HotSplit Probes Kit
10.682	200 rxn	Quantimix HotSplit Probes Kit
10.683	500 rxn	Quantimix HotSplit Probes Kit
10.685M	20 rxn	Quantimix HotSplit Probes-ROX Kit
10.686	100 rxn	Quantimix HotSplit Probes-ROX Kit
10.687	200 rxn	Quantimix HotSplit Probes-ROX Kit
10.688	500 rxn	Quantimix HotSplit 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. 04 – Marzo 2017

1. DESCRIPCIÓN

QUANTIMIX HOTSPLIT PROBES KIT es una master mix optimizada para ensayos de amplificación en tiempo real utilizando sondas de hidrólisis fluorescentes para la detección y cuantificación del ADN molde. Este kit es compatible con sondas de hidrólisis (ej. Taqman®; ZEN™ *double-quenched probes*).

QUANTIMIX HotSplit Probes kit es proporcionado en formato *Master Mix 2X* que incluye todos los componentes necesarios para la amplificación del ADN, excepto el molde, los primers y la sonda. El formato master mix facilita la manipulación reduciendo el tiempo de operación y las etapas de pipeteo.

El Quantimix HotSplit Probes incluye en su composición la *Biotools HotSplit DNA Polymerase*, enzima con activación "hot start" que asegura un rendimiento de reacción óptimo, por aportar elevada especificidad y sensibilidad a las reacciones de amplificación, a la vez que minimiza las amplificaciones espurias.

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.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

- **QUANTIMIX HotSplit Probes Mix:** *Master mix 2X* lista para su uso que contiene todos los componentes para llevar a cabo la amplificación en tiempo real: Biotools HotSplit DNA Polymerase, dNTPs, Buffer de Reacción, estabilizantes y MgCl₂.

- **ROX™ DYE:** Disponible en algunas referencias. Este fluorocromo se provee a una concentración 50X.

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Almacenar el QUANTIMIX HotSplit Probes Kit a **-20°C** en un congelador que garantice una temperatura constante (no se recomiendan congeladores *frost-free*) y evitar ciclos frecuentes de congelación/descongelación. Para almacenamiento corto o uso frecuente pueden conservarse alícuotas a 4 °C.

ROX™ DYE (disponible en algunas referencias). 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.

Una vez descongelado el kit mezclarlo con suavidad antes de usar a fin de minimizar la formación de espuma. Mantener la mezcla en hielo durante su manipulación.

4. INSTRUCCIONES DE USO

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, 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 a fin de evitar su degradación.

Utilizar entre 10-1000 copias de ADN molde para cada reacción de amplificación; esta cantidad de molde equivale a aproximadamente 100 pg-1 µg de ADN_g o de ADN_c procedente de 1pg-100 ng de ARN total. Un exceso de molde puede arrastrar niveles elevados de contaminantes que inciden negativamente en la eficiencia de la reacción.

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 inhiben la amplificación y la lectura de fluorescencia. Biotools recomienda su línea de productos Speedtools para la extracción y purificación de ADN a partir de muestras de diferente origen: sangre (*Speedtools DNA Extraction Kit*), tejido (*Speedtools Tissue DNA Extraction Kit*), comida (*Speedtools Food DNA Extraction Kit*) y 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 incorporar. Por la elevada sensibilidad de la qPCR pocas copias del ADN molde suelen ser suficientes para iniciar la amplificación. Para 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. El kit ha sido optimizado con diferentes moldes que incluyen: ADN genómico, ADN_c, y ADN plasmídico.

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.

Al diseñar los primers tener en cuenta que los amplicones para PCR en tiempo real deben tener □ 500 bp, siendo el tamaño óptimo entre 75-150 bp. A fin de reducir el tiempo de ciclado, se aconseja seleccionar primers con una T_m próxima a 60 °C y utilizar programas de amplificación de 2-pasos, en lugar de programas de 3-pasos.

La concentración de primers recomendada es de 0.2-0.9 µM; utilizar entre 0.3-0.5 µM para la optimización inicial.

En lo que respecta a la **concentración de sonda**, si bien depende del tipo de sonda utilizada, la concentración óptima suele encontrarse en el rango de 0.1-0.5 µM; utilizar 0.2 µM como concentración de partida para la optimización.

Programa de PCR: Ciertos parámetros de la programación afectan tanto la especificidad como la eficiencia de la amplificación.

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. Para primers con T_m próxima a 60 °C y utilizar programas de amplificación de 2-pasos.

El QUANTIMIX HotSplit Probes kit contiene una polimerasa químicamente modificada que presenta escasa o nula actividad a temperaturas bajas. La actividad enzimática se recupera durante el paso de Desnaturalización Inicial, aplicar entre 5-10 min a 94 °C.

Si bien el Quantimix HotSplit Probes kit amplifica correctamente utilizando volúmenes de reacción entre **20-50 µL**, los volúmenes de reacción recomendados son 20-25 µL.

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.

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

- 1.- Descongelar y mezclar suavemente la mezcla 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.- Preparar la mezcla de reacción siguiendo las instrucciones de la TABLA 1. EVITAR UNA EXPOSICIÓN PROLONGADA DE LA MEZCLA 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 mezcla de reacción

COMPONENTE	Concentración Final	20 µL rxn	25 µL rxn	50 µL rxn
2X Quantimix HotSplit Probes Mix	1 X	10 µL	12.5 µL	25 µL
Primers	0.2-0.9 µM	x µL	x µL	x µL
Sonda	0.1-0.5 µM	x µL	x µL	x µL
ROX™ Dye	1X	0,4 µl	0,5 µl	1 µl
Agua libre de nucleasas	-	Hasta 20 µL	Hasta 25 µL	Hasta 50 µL
ADN molde	variable	x µL	x µL	x µL

Proceder 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 reacción. Colocar todos los reactivos en hielo hasta su introducción en el termociclador.

5.- Añadir el ADN molde a cada vial de reacción. Cerrar los viales, mezclar cuidadosamente (no utilizar vortex) y centrifugar ligeramente.

Proceder al área de amplificación o PCR

6.- Programar el termociclador. En la Tabla 2 se recomienda un programa de 3-pasos y otro de 2-pasos según la T_m de los primers. 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 HotSplit Probes kit

A) Programa de Amplificación en 3-Pasos (para primers con T_m < 55°C)

PASOS	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	94°C	8 min
Desnaturalización	30-45	94-96°C	10-30 seg
Anillamiento		2-5 °C □ T _m de primers	10-30 seg
Extensión*		60-67°C	60 seg

*Lectura de fluorescencia en el paso de Extensión

B) Programa de Amplificación en 2-Pasos (para primers con T_m ≥ 55°C)

PASOS	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	94°C	8 min
Desnaturalización	30-45	94-96°C	10-30 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 la fluorescencia se realiza simultáneamente para el fluoróforo específico y ROX™ Dye, en el canal adecuado.

7.- Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el ciclado.

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. **Almacenamiento inadecuado de primers y sonda.** La degradación de primers y sondas por almacenamiento inadecuado reduce la especificidad de la reacción y la razón señal-ruido (fluorescencia).
3. **Presencia de inhibidores en la mezcla de reacción.** Verificar la presencia de inhibidores realizando diluciones seriadas del ADN molde. Si el rendimiento de reacción es superior (menor ct) en las diluciones mayores, evidenciará presencia de inhibidores y se deberá repetir la reacción con una muestra de ADN nueva y convenientemente purificada.
4. **Retrotranscripción ineficiente.** Cuando se utiliza ADNc como molde una baja eficiencia de reacción puede deberse a un fallo en la reacción de retrotranscripción; corroborar que las condiciones de esta reacción sean las idóneas y que el molde obtenido no se encuentre degradado.
5. **Falta de homogeneidad en reactivos.** Mezclar convenientemente los reactivos de reacción antes de introducir los viales en el termociclador.
6. **Problema con los primers.** Diseñar primers con una temperatura de anillamiento superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers. Optimizar la *concentración de primers*: Una concentración de primers deficiente reducirá el rendimiento de la reacción de amplificación; incrementar la concentración de los primers en incrementos de 0.1 µM.
7. **Reducir el tamaño del producto de PCR.** Diseñar nuevos primers que permitan obtener productos de PCR de tamaño entre 75-150 bp.
8. **Asegurarse que la sonda fluorescente sea específica para el molde a amplificar.** Además, revisar la concentración de la sonda incorporada en la reacción.
9. **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 (hasta 11 min).
10. **Reducir la temperatura de anillamiento.** Escoger programa de amplificación de 3-pasos y reducir la temperatura de anillamiento en decrementos de 2°C.
11. **Incrementar el número de ciclos.** Incorporar más ciclos en el programa de amplificación en incrementos de 5 ciclos.
12. **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.
13. **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. **Problema con la sonda.** Asegurarse que la sonda seleccionada sea específica para el molde a amplificar. Optimizar la *concentración de sonda*, reducir la cantidad de sonda en decrementos de 0.05 µM.
5. **Incrementar la temperatura de anillamiento.** Utilizar temperaturas de anillamiento superiores, en incrementos de 2°C, o bien escoger un programa de amplificación en 2-pasos.
6. **Reducir el número de ciclos.** Disminuir el número de ciclos del programa de amplificación, en incrementos de 5 ciclos.