

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.

QUANTIMIX HOTSPLIT EASY KIT

Kit para Amplificación y Cuantificación de ADN en Tiempo Real para ser utilizado con fluoróforo intercalante

(Incluye Biotools HotSplit DNA Polymerase)

Ref.	FORMATO	CONTENIDO
10.690M	20 rxn	Quantimix Hotsplit Easy Kit
10.691	100 rxn	Quantimix Hotsplit Easy Kit
10.692	200 rxn	Quantimix Hotsplit Easy Kit
10.693	500 rxn	Quantimix Hotsplit Easy Kit
10.695M	20 rxn	Quantimix Hotsplit Easy-ROX Kit
10.696	100 rxn	Quantimix Hotsplit Easy-ROX Kit
10.697	200 rxn	Quantimix Hotsplit Easy-ROX Kit
10.698	500 rxn	Quantimix Hotsplit Easy-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. 07 – Marzo 2017

1. DESCRIPCIÓN

El **QUANTIMIX HOTSPLIT EASY KIT** es una *master mix* universal optimizada para conseguir la máxima eficiencia, precisión y sensibilidad en reacciones de amplificación en tiempo real utilizando SYBR® Green I. Esta mezcla incluye una versión químicamente modificada de la Biotools DNA Polymerase, Biotools HotSplit DNA Polymerase, que presenta escasa o nula actividad a bajas temperaturas y proporciona mayor especificidad y rendimiento en las amplificaciones de ADN.

En el **QUANTIMIX HOTSPLIT Kit** la señal fluorescente es generada por el intercalado inespecífico de las moléculas de SYBR® Green I en los productos de ADN de cadena doble. Durante la fase exponencial de la amplificación existe una correlación entre el producto amplificado y el ADN presente en la muestra; y el nivel de fluorescencia generado es proporcional al producto amplificado en cada ciclo.

La Biotools HotSplit DNA Polymerase, componente del kit, asegura alta especificidad y sensibilidad en las reacciones de amplificación, resolviendo problemas frecuentes de la PCR como la formación de dímeros de primers, amplificaciones inespecíficas y otras reacciones no deseadas que ocurren durante la preparación de las mezclas de reacción. Grupos bloqueantes termolábiles actúan sobre los aminoácidos implicados en la polimerización de la polimerasa; la interferencia de estos grupos es eliminada durante la desnaturalización inicial recuperando la actividad enzimática. Por otra parte, la enzima Biotools HotSplit DNA Polymerase posee una tasa de error inferior a la de enzimas comerciales similares.

Alguna de las variantes del kit incluyen el fluorocromo de Referencia ROX™ que permite normalizar variaciones inespecíficas de la 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™ en la reacción de amplificación es opcional, por lo cual éste se provee en un tubo independiente.

QUANTIMIX HOTSPLIT EASY KIT es una *Master Mix 2X* (QUANTISPLIT), que incluye todos los componentes de reacción, excepto el ADN y los primers. La utilización de la *Master Mix* facilita la manipulación reduciendo tanto el tiempo de operación como las etapas de pipeteo.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

- **QUANTISPLIT:** Es una solución 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, SYBR® Green I y MgCl₂ a la concentración óptima (4mM final).
- **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 **QUANTIMIX HOTSPLIT EASY Kit** a **-20°C** en un congelador que garantice una temperatura constante (no se recomiendan los congeladores *frost-free*). Todos los reactivos deben ser descongelados y manipulados en hielo.

QUANTISPLIT: Conservar en **oscuridad**. Minimizar el número de ciclos de congelación-descongelación conservando la mezcla en alícuotas de trabajo. Mezclar antes de usar.

MgCl₂ Solution: Mezclar exhaustivamente antes de usar.

ROX™ DYE: Conservar en **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 instrucciones, su estabilidad será la indicada en la etiqueta correspondiente.

4. CONSIDERACIONES GENERALES

Molde: La calidad 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, numerosos componentes como detergentes iónicos, colorantes, fenoles, pueden inhibir la amplificación.

Para la purificación del ADN pueden utilizarse extracción con fenol o métodos de purificación con resinas. Cualquiera de ellos suele garantizar un rendimiento y calidad de ADN óptimos. En caso de utilizar métodos con matriz de sílice, asegurarse de eliminar completamente las partículas de sílice en la muestra ya que ésta suele inhibir la amplificación y la lectura de fluorescencia. Biotools recomienda su línea *Speedtools* para la extracción y purificación de ADN genómico 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*).

Se recomienda transportar las muestras de ADN en frío ya que la falta de refrigeración puede degradar el ADN. En caso de manipular muestras clínicas, tratarlas como si éstas fueran potencialmente infecciosas.

La cantidad de ADN a agregar en la reacción de amplificación dependerá del origen y de la calidad del molde a utilizar. Nosotros recomendamos cuantificar el ADN mediante espectrometría a 260/280 nm 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. El uniformar la cantidad de molde en la reacción permite obtener resultados cuantitativos comparables.

Concentración de MgCl₂: Concentraciones elevadas de MgCl₂ pueden dar lugar a la formación de productos inespecíficos y baja fidelidad de copia; y una concentración baja puede reducir el rendimiento del producto de PCR específico. El rango de concentración recomendado es 4-6 mM. La concentración final de MgCl₂ en la mezcla de reacción, aportada por el **QUANTISPLIT** es de 4 mM, concentración óptima para la mayoría de los ensayos. No obstante, el kit contiene un vial de MgCl₂ 50 mM adicional que permite optimizar su concentración.

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: 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'.

A fin de evitar la formación de dímeros de primers, que interfieren negativamente en la cuantificación, la concentración de cebadores óptima para ensayos de qPCR con fluoróforos intercalantes suele ser inferior a la utilizada en ensayos de amplificación con sondas específicas. La concentración recomendada se encuentra en el rango de 0.05-0.3 µM.

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 convencional, usualmente menos de 500 bp. Los mejores resultados de *real time PCR* suelen obtenerse con productos de amplificación entre 100-300 bp.

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. Variaciones en el tamaño del producto de amplificación pueden inducir cambios en el programa de amplificación.

El QUANTIMIX HOTSPLIT EASY kit contiene una polimerasa químicamente modificada que presenta escasa o nula actividad a bajas temperaturas. La actividad de la enzima se recupera durante el paso de Desnaturalización Inicial; 10 min a 96°C suelen ser suficientes para activarla completamente.

La Biotools HotSplit DNA Polymerase posee, además, una baja tasa de error y requiere un tiempo de extensión a 72°C mayor que el de las polimerasas convencionales.

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 muy baja incrementa el riesgo de formación de dímeros de primers y/o productos de amplificación inespecíficos.

Cuando se utiliza fluoróforos intercalantes es esencial realizar una **curva de melting** a fin de corroborar la especificidad de los productos de PCR obtenidos.

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.

Para la obtención de resultados óptimos, es esencial MANTENER REFRIGERADOS LOS TUBOS DE REACCIÓN hasta su introducción en el termociclador.

Trabaja en el área de preparación de reactivos en una cabina de flujo laminar. A fin de evitar contaminaciones y falsos negativos utilice guantes y material plástico estéril y libre de nucleasas. También se recomienda el uso de puntas de pipeta con filtro.

1.- Descongelar y mezclar cuidadosamente los reactivos antes de su dispensación (no utilizar vortex). PROTEGER LOS VIALES DE QUANTISPLIT Y DE ROX™ DE UN EXPOSICIÓN PROLONGADA A LA LUZ.

2.- Determinar el número de muestras a procesar. 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 *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*.

TABLA 1. Preparación de la Master Mix

COMPONENTE	Concentración Final	20 µl rxn
2X QUANTISPLIT	1 X	10 µl
50 mM MgCl ₂ Solution*	4-6 mM	x µl
Primers	0.05-0.3 µM	x µl
ROX™ Dye	1X	0,4 µl
Agua destilada estéril	-	Hasta 20 µl
ADN molde	variable	x µl

*Sólo necesario para concentraciones de MgCl₂ >4mM

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

TABLA 2. Programa de PCR para QUANTIMIX HOTSPLIT EASY Kit

PASOS	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial y Activación Enzimática	1	94-96°C	8-10 min
Desnaturalización Anillamiento Extensión*	30-50	95-98°C	5-20 seg
		2-5°C<T _m de los primers	5-10 seg
		70-72°C	30-60 seg
Adquisición de Fluorescencia (Ver Nota 1)	1	T _m de los productos inespecíficos <X<T _m de productos específicos	10-15 seg ⁺
Disociación o Melting*	1	60-95°C	Se recomienda rampa de 0.5 °C/seg

* Lectura de fluorescencia en los pasos de Extensión y Melting.

+ El menor tiempo necesario para la lectura de fluorescencia (variable entre termocicladores)

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

6.- Centrifugar brevemente los viales de amplificación.

Proceda al área de amplificación o PCR

7.- Colocar los tubos en el termociclador.

8.- Programar el termociclador según la guía de la Tabla 2.

Nota 1: En caso de utilizar ROX™ Dye, la lectura de la fluorescencia se realiza simultáneamente para SYBR® Green I y ROX™ Dye en el canal correspondiente

Nota 2: 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

Ausencia de amplificación o baja eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del ADN.** Corroborar la calidad del molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Puede realizar una extracción orgánica seguida de precipitación con etanol para eliminar inhibidores de la amplificación. Un exceso de ADN 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. **Incrementar el tiempo de desnaturalización inicial.** Ampliar el tiempo de desnaturalización inicial hasta 10 minutos a fin de asegurar la completa activación de la Biotools HotSplit DNA Polymerase.
5. **Reducir la temperatura de anillamiento.** Reducir la temperatura de anillamiento en incrementos de 2°C.
6. **Incrementar el número de ciclos.** Incorporar más ciclos en el programa de amplificación en incrementos de 5 ciclos.
7. **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.
8. **Activar la etapa de detección.** Corroborar que la etapa de detección de fluorescencia ha sido activada al programar el termociclador.
9. **Corroborar la programación de la etapa de detección.** Confirmar que la detección de la fluorescencia se realice en el paso adecuado del programa
10. **Seleccionar un filtro compatible con el fluoróforo intercalante.** Para termocicladores de tiempo real que posean múltiples canales de detección, corroborar que el filtro activado sea compatible con el SYBR® Green I.

Productos de amplificación inespecíficos o smear

1. **Reducir la concentración de los componentes de reacción.** Corroborar la concentración de molde mediante electroforesis en gel de agarosa o por fluorimetría. Reducir la cantidad de ADN y/o de primers en la 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. **Reducir la concentración de primers.** Un exceso de primers favorece la formación de dímeros y/o productos de amplificación inespecíficos a los que también se intercala el SYBR® Green I. Para ensayos de qPCR con fluoróforos intercalantes la concentración de primers recomendada es inferior a la utilizada con sondas específicas (0.05-0.3 µM).
4. **Rediseñar los primers.** Diseñar primers con una T_m superior y que no formen horquillas y/o dímeros de primers.
5. **Incrementar la temperatura de anillamiento.** Utilizar temperaturas de anillamiento superiores, en incrementos de 2°C.
6. **Reducir el número de ciclos.** Disminuir el número de ciclos del programa de amplificación, en incrementos de 5 ciclos.
7. **Reducir el tamaño del producto de PCR.** Diseñar nuevos primers que permitan obtener productos de PCR de tamaño entre 100-300 bp.
8. **Realizar curva de melting post-amplificación.** La realización de la curva de disociación permite confirmar de manera simple la especificidad de la señal de amplificación pudiendo descartar artefactos como dímeros de primers o productos de amplificación inespecíficos.

Falta de linealidad en la curva de amplificación

1. **Corroborar la cantidad del ADN molde.** Un exceso de molde puede afectar la linealidad.
2. **Incluir un paso adicional de Adquisición de Fluorescencia.** Productos de amplificación inespecífica pueden afectar la linealidad (Ver Nota 1).
3. **Realizar curva de melting post-amplificación.** Permite descartar artefactos como dímeros de primers o productos de amplificación inespecíficos.

Fluorescencia en control negativo (sin ADN molde)

1. **Repetir el ensayo con reactivos nuevos y tomando las precauciones apropiadas.** Si la T_m de los controles negativos es similar a la T_m de las muestras positivas (contaminación).
2. **Incluir un paso adicional de Adquisición de Fluorescencia.** Si la T_m de los controles negativos es < T_m de las muestras positivas (dímeros de primer) (Ver Nota 1).