



MASTER MIX qPCR 2.0

Sybr/ROX



**PB-L
Productos[®]
Bio-Lógicos**

www.pb-l.com.ar

Master Mix qPCR 2.0 Sybr/ROX

Cat. no. EA24

Presentaciones

Contenidos	EA24-01	EA24-02
	25 µl × 100 reac	25 µl × 500 reac
Master Mix qPCR 2.0 2x (con SYBR Green I)	1,25 ml	5 × 1,25 ml
ROX 50x (Colorante de Referencia)	50 µl	250 µl
ddH ₂ O libre de DNasas y RNasas	1 ml	5 × 1 ml
Manual	1	1

Almacenamiento

El kit de Master Mix qPCR 2.0 (Sybr/ROX) debe ser almacenado a -20°C, protegido de la luz. Al descongelar los componente del kit, homogenizarlos con pipeta antes de su uso. Para un uso frecuente, la puede ser almacenada a 2-8°C por 3 meses. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelación/ descongelación.

Introducción

El sistema Master Mix qPCR 2.0 (Sybr/ROX) contiene una nueva formulación de componentes optimizados que permite obtener mayor sensibilidad, y reproducibilidad en los ensayos. El sistema genera curvas de amplificación con mayor amplitud y menor Ct respecto a otras marcas. Este producto fue diseñado para ser compatible con diferentes equipos de Real time PCR (ver más adelante). Por otro lado, esta mastermix permite configurar reacciones de hasta 10 ul finales, reduciendo los costos por reacción. Esta mastermix está desarrollada para realizar Real-time PCR con moléculas intercalantes fluorescentes (SYBR Green, Eva Green entre otras). Esta mix contiene todos los componentes

necesarios para una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real. Solo se debe agregar los primers y el molde (ADN o ADNc). La Master Mix qPCR 2.0 (Sybr/ROX) contiene una enzima *Taq* ADN polimerasa Hot Start, para disminuir la formación de dímeros de primers. Por otro lado, incluye una mezcla de dNTP/dUTP que permite la utilización de la enzima UDG (Uracil-DNA Glycosylase) para eliminar contaminantes provenientes del arrastre de productos de amplificación.

Notas Importantes

1. La Master Mix qPCR 2.0 incluye el SYBR Green I. Evitar la exposición directa a luz fuerte durante la preparación de la reacción de qPCR.
2. Agitar la Master Mix qPCR 2.0 suavemente por inversión ó pipeta y centrifugar brevemente antes del uso. **No usar vortex** y **evitar** la generación de **burbujas**.
3. La pureza y homogeneidad de tamaño de los primers es muy importante para obtener una alta especificidad en la qPCR. Se recomienda usar primers purificados por PAGE u otro método superior.
4. Típicamente, los mejores resultados de amplificación se obtienen usando una concentración de primer de 0,3 μM . Sin embargo, recomendamos determinar la concentración óptima titulando cada primer en el rango de 0,15 μM a 0,5 μM .
5. Para un volumen de reacción de 20 μl , la cantidad de molde (ADNg o ADNc) necesaria usualmente es menor a 100 ng. Si se usan como molde los productos directos de una transcripción reversa (sin purificar), el volumen de reacción de síntesis de ADNc agregado no debe superar el 20% del volumen total de la reacción de qPCR.

Este producto fue desarrollado únicamente para su uso exclusivo en laboratorios de investigación.

Protocolo

<1> Armado de la reacción de Real Time PCR

Nota: La Master Mix qPCR 2.0 y el colorante de referencia ROX 50x deben ser almacenados en oscuridad o protegidos de la luz.

1. Descongelar la Master Mix qPCR 2.0 SYBR /ROX (si se la almacenó a -20°C), el colorante de referencia 50x ROX, el molde, los primers y el ddH₂O libre de DNasas y RNasas. Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente y homogenizarlos antes de usar.
2. Preparar la reacción de acuerdo a la siguiente tabla. Todos los pasos deben ser realizados manteniendo los tubos en hielo.

Componentes	25 μl	20 μl	10 μl	Concentración final
Master Mix qPCR 2.0 2x	12,5 μl	10 μl	5 μl	1x
Primer directo (10 μM)	0,75 μl	0,6 μl	0,3 μl	0,3 μM^{*1}
Primer reverso (10 μM)	0,75 μl	0,6 μl	0,3 μl	0,3 μM^{*1}
Molde (ADNg o ADNc) ^{*2}	x μl	x μl	x μl	-ng o -pg
Colorante de referencia 50x ROX ^{*3}	x μl	x μl	x μl	-
ddH ₂ O libre de RNasas	c.s.p. 25 μl	c.s.p. 20 μl	c.s.p. 10 μl	-

^{*1} La concentración final de primer de 0,3 μM es óptima para muchas aplicaciones. Se pueden usar concentraciones mayores si la eficiencia de amplificación no es adecuada. Sin embargo, si se observan productos de amplificación inespecíficos o dímeros de primers, puede probarse concentraciones inferiores (Ver Notas Importantes).

^{*2} Tener en cuenta lo indicado en Notas Importantes.

^{*3} La concentración óptima del colorante de referencia ROX frecuentemente utilizado en los equipos de Real Time PCR es:

Instrumento	Concentración final
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT, STEP ONE	1X (por ej. 1 µl ROX 50X/ 50 µl volumen)
ABI 7500, 7500 Fast; Stratagene Mx3000P, Mx3005P and Mx4000,	0.1X (por ej. 0,1 µl ROX 50X/ 50 µl volumen)
Instrumentos de Roche, Bio-Rad y Eppendorf	No es necesario el agregado

<2> Amplificación

Usualmente, los mejores resultados se obtienen utilizando un ciclado de qPCR en dos pasos. Sin embargo, si esta no otorga resultados adecuados (por ej. amplificaciones inespecíficas causadas por baja concentración de molde o limitada eficiencia de amplificación inducida por valores de T_m bajos), la qPCR en tres pasos es recomendada.

qPCR en dos pasos

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Desnaturalización Inicial	1x	94°C	5 min	Desnaturalización Inicial	No
PCR	45x	92°C	15 seg	Desnaturalización	No
		60-65°C* ¹	30 seg/ 500 nt	Hibridación/ Extensión	Si
Etapas de la curva de Melting/Disociación					

qPCR en tres pasos

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Desnaturalización Inicial	1x	94°C	5 min	Desnaturalización Inicial	No
PCR	45x	92°C	15 seg	Desnaturalización	No
		50-60°C* ²	20 seg	Hibridación	No
		72°C	30 seg/ 500 nt	Extensión	Si
Etapa de la curva de Melting/Disociación					

*1 Una temperatura de Hibridación/Extensión de 60°C es óptima para muchas aplicaciones. Sin embargo, si se necesita una optimización posterior, se pueden probar temperaturas en el rango 60°C a 66°C.

*2 Normalmente, la temperatura de hibridación debe ser 5°C menor que el valor de T_m de los primers. Sin embargo, la temperatura de hibridación puede ser optimizada entre 50-65°C para mejorar la performance de la reacción.

3. Cerrar los tubos y mezclar suavemente. Centrifugar brevemente para coleccionar cualquier líquido residual en las paredes y la tapa.
4. Colocar los tubos de PCR en el ciclador térmico y comenzar el ciclado de qPCR.

Guía de Problemas

1. No se detecta señal, o hay una detección tardía de la señal, o se detectan únicamente dímeros de primers.

Comentarios	Sugerencias
El programa de qPCR no produce los resultados esperados	Modificar el ciclado térmico de acuerdo a los parámetros provistos en este manual.
Baja eficiencia en la reacción	Ajustar la concentración de primers. Controlar la posible degradación de los mismos en un PAGE. Si es necesario, rediseñar los primers.
Parámetro de Linealidad (R^2) menor a 0,98	Controlar la concentración, condiciones de almacenamiento, y la calidad del molde. Repetir la qPCR usando nuevas diluciones o moldes patrones purificados con mayor calidad.

2. Alta fluorescencia en el control “Sin Molde”

Comentarios	Sugerencias
Contaminación de los reactivos	Descartar los componentes de la reacción y repetir la qPCR con reactivos nuevos. Tomar las precauciones adecuadas (por ej. Usar tips con filtro), guantes, y no abrir las muestras amplificadas en el mismo lugar donde se prepara la reacción.

3. Generación de dímeros de primers y/o productos inespecíficos

Comentarios	Sugerencias
Concentración de primers subóptima	Optimizar la concentración de cada primer desde 0,15 uM hasta 0,7 uM
La concentración de Mg^{2+}	La concentración de Mg^{2+} provista en la Master Mix

no es óptima	qPCR 2.0 2x es de 2 mM. Para algunos moldes, un incremento de hasta 5 mM Mg ²⁺ puede ser necesario. Ensayar concentraciones de Mg ²⁺ con deltas de 0.5 mM.
La temperatura de hibridación es muy baja	Incrementar la temperatura de hibridación en etapas de 2°C.
El diseño de los primers no es óptimo	Revisar el diseño de los primers.
El producto de qPCR es muy grande	La longitud de los productos no debería exceder los 500 bp. Para obtener resultados óptimos, el rango de tamaño de los productos debería estar entre 100-150 pb.

4. Ausencia de linealidad en la relación CT / cantidad de molde

Comentarios	Sugerencias
Funcionamiento erróneo del equipo	Recurrir al manual de instrucciones específico.
Contaminación del molde	Preparar nuevo molde y/o diluciones.
Almacenamiento prolongado de las diluciones de molde	Realizar nuevas diluciones seriadas del molde a partir de la solución stock. Repetir la qPCR con las nuevas diluciones
Escasa repetibilidad	Volumen de reacción muy pequeño. Probar los volúmenes mayores indicados en el manual de instrucciones.

5. Alertas en el programa

Comentarios	Sugerencias
Al utilizar este producto en los equipos de Applied Biosystems <i>StepOne™</i> and	Esto es consecuencia de una elevada amplitud de la señal de fluorescencia asociada a una alta concentración de molde inicial. Puede solucionarse

<p><i>StepOne Plus™</i>, puede ocurrir la aparición de una alerta o <i>Flag</i>: “BADROX: Bad passive reference signal”.</p>	<p>disminuyendo la cantidad de molde o duplicando la concentración final del reactivo de referencia Rox.</p>
--	--

6. Diferencia de la temperatura de melting

Comentarios	Sugerencias
<p>Puede detectarse una diferencia de 1°C en la T^oCmelting respecto a otra marca</p>	<p>Esto es de los componentes de reacción de cada marca. Se recomienda comparar este parámetro con reacciones realizadas con la misma mastermix .</p>