

One-Step RT-PCR



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

www.pb-l.com.ar

One Step RT-PCR

Cat. no. EA14

Presentaciones

Contenido	EA1401	EA1402	EA1403
	25 µl × 50 reac	25 µl × 100 reac	25 µl × 500 reac
One Step RT-PCR 2x	625 µl	1,25 ml	5 x 1,25 ml
Mix de enzimas 25x	50 µl	100 µl	500 µl
DTT 100 mM	125 µl	250 µl	1250 µl
Agua Ultrapura – Libre de nucleasa	1,5 ml	1,5 ml	5 × 1,5 ml
Manual	1	1	1

Almacenamiento

El kit *One-Step* RT-PCR debe ser almacenado a -20 °C. Al descongelar los componentes del kit, homogenizarlos en vortex y centrifugarlos antes de su uso. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelación/descongelación.

Introducción

El producto *One-Step* RT-PCR kit permite la síntesis de cADN y la amplificación por PCR de punto final en una única reacción, utilizando *primers* específicos.

La *mix de enzimas (25x)* contiene la retrotranscriptasa M-MLV *transcripta*, junto con la *Taq Pegasus* ADN polimerasa. La M-MLV *transcripta* es una enzima mutante de la retrotranscriptasa M-MLV, la cual posee mayor termoestabilidad y actividad RNasa H reducida. La *Taq Pegasus* es una ADN polimerasa termoestable capaz de replicar ADN a 72 °C y mantener su funcionalidad luego de ser incubada a 95 °C por períodos prolongados.

Ambas enzimas son funcionales en *One Step RT-PCR Mix 2x*, permitiendo que la síntesis de cADN y la amplificación por PCR del producto delimitado por los *primers* específicos, ocurra en un único tubo de reacción. La *One Step RT-PCR Mix 2x* contiene todos los componentes necesarios para una reacción, a excepción de los *primers* y el molde. Su composición ha sido optimizada para obtener la máxima sensibilidad y especificidad aun partiendo de bajas concentraciones de molde.

El producto *One-Step RT-PCR* puede ser utilizado con ARN total o ARNm como molde, en una concentración final de hasta 0,1 pg/μl (este valor puede variar dependiendo de la abundancia relativa de la región *target* respecto del ARN total).

Notas Importantes

1. Se recomienda utilizar inhibidor de RNasas durante la reacción (*RNase Inhibitor*, IC0101).
2. La pureza y calidad del molde de la reacción son esenciales para garantizar la eficiencia de la amplificación.
3. Para regiones de baja abundancia relativa en la muestra de ARN total se recomienda aumentar la masa de molde.
4. Típicamente, los mejores resultados de amplificación se obtienen usando una concentración de primer de 0,5-1 μM. Sin embargo, el usuario puede determinar la concentración óptima titulando cada primer en el rango de 0,1 μM a 1 μM.
5. Se recomienda incluir controles positivos y negativos para validar los resultados.

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

Protocolo

1. Descongelar los componentes del Kit *One-Step RT-PCR* y homogenizarlos antes de usar.
2. Preparar la reacción de acuerdo a la siguiente tabla. Se recomienda realizar el protocolo manteniendo los tubos en hielo. Adicionar el molde de ARN como último componente de la reacción

Componentes	Volumen	Concentración final
<i>One Step RT-PCR Mix</i> 2x	12,5 µl	1x
<i>Mix de enzimas</i> 25x	1 µl	1x
DTT 100 mM	2,5 µl	10 mM
Primer Fw 10 µM	1,25 µl	0,5 µM* ¹
Primer Rev 10 µM	1,25 µl	0,5 µM* ¹
ARN molde		1-100 pg RNA total* ² 1 pg-100 ng ARNm
Agua Ultrapura - Libre de nucleasas	c.s.p. 25 µl	-

*¹ La concentración final de primer de 0,5 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*, pueden probarse concentraciones inferiores (ver **Notas Importantes**).

*² Tener en cuenta lo indicado en **Notas Importantes**.

3. Programar el ciclado en el termociclador según la siguiente tabla:

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
Síntesis de cADN	1	42-55 °C	30 min ^{*1}	Retrotranscripción
Inactivación de la M-MLV <i>transcripta</i>	1	94 °C	1 min ^{*2}	Desnaturalización Inicial
Amplificación por PCR	40	94 °C	15 seg	Desnaturalización
		50-65 °C ^{*3}	15 seg	Hibridación
		72 °C	30 seg/ 500 nt	Extensión
	1	72 °C	2 min	Extensión Final

^{*1} La temperatura de síntesis del cADN puede variar entre 42-55 °C. La incubación típica suele ser 30 min. Sin embargo, dependiendo del tamaño de la molécula *target*, este tiempo puede variar desde 15-60 min.

^{*2} Un minuto de incubación a 94 °C es suficiente para inactivar a la M-MLV *transcripta*, sin embargo, esta incubación se puede extender si se requiere la desnaturalización de moldes muy estructurados.

^{*3} 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.

4. Colocar los tubos de PCR en el termociclador y comenzar el ciclado de PCR.

5. Analizar los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa.