



SUPRA Sybr/Rox

Master MIX qPCR



**PB-L
Productos
Bio-Lógicos®**

www.pb-l.com.ar

SUPRA Sybr/Rox Master Mix qPCR

Cat. no. EA18

Presentaciones

Contenidos	EA1801 100 reac	EA1802 500 reac
Master Mix qPCR 2.0 Sybr 2x	1,25 ml	5 × 1,25 ml
ROX 50x (Colorante de Referencia)	50 µl	250 µl
UDG (1U/ul)	100 µl	500 µl
Agua ultrapura – Libre de nucleasas	1,5 ml	5 × 1 ml
Manual	1	1

Almacenamiento

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

Introducción

El Kit SUPRA Sybr/Rox Master Mix qPCR está especialmente diseñado para realizar Real-time PCR basada en la detección de fluorescencia emitida por SYBR Green I. 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 2x contiene una enzima *Taq* ADN polimerasa Hot Start, para disminuir la formación de dímeros de *primers*. Por otro lado, incluye la enzima UDG (Uracil-DNA Glycosylase) y una mezcla de dNTPs/dUTP que permite eliminar

contaminantes provenientes del arrastre de productos de amplificación. La concentración de sus reactivos ha sido optimizada para obtener máxima sensibilidad y especificidad. Sin embargo en algunas reacciones la adición de Mg puede mejorar la eficiencia del sistema

Notas Importantes

1. La Master Mix qPCR 2.0 Sybr 2x, 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 Sybr 2x 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, el usuario puede 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 Sybr 2x 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 2x (si se la almacenó a -20°C), el colorante de referencia ROX 50x, el molde, los *primers* y el agua ultrapura libre de nucleasas. 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	50 μl	25 μl	20 μl	Concentración final
Master Mix qPCR 2.0 Sybr 2x	25 μl	12,5 μl	10 μl	1x
<i>Primer</i> directo (10 μM)	1,5 μl	0,75 μl	0,6 μl	0,3 μM^{*1}
<i>Primer</i> reverso (10 μM)	1,5 μl	0,75 μl	0,6 μl	0,3 μM^{*1}
Molde (ADNg o ADNc) ^{*2}	x μl	x μl	x μl	-ng o -pg
Colorante de referencia Rox 50x ^{*3}	x μl	x μl	x μl	-
UDG [1U/ μl]	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 U
Agua ultrapura libre de nucleasas	c.s.p. 50 μl	c.s.p. 25 μl	c.s.p. 20 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

Al utilizar este producto en los equipos de Applied Biosystems *StepOne™* and *StepOne Plus™*, puede ocurrir la aparición de una alerta o *Flag*: “BADROX: Bad passive reference signal”. Esto es consecuencia de una elevada amplitud de la señal, lo que puede solucionarse disminuyendo la cantidad de molde o duplicando la concentración final del reactivo de referencia Rox.

<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

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Incubación UDG	1	37°C	10	1	No
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
Etapa de la curva de Melting/Disociación					

qPCR en tres pasos

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Incubación UDG	1	37°C	10	1	No
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 colectar 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.
La concentración de <i>primers</i> no es la óptima	Ajustar la concentración de <i>primers</i> . Controlar la posible degradación de los mismos en un PAGE. Si es necesario, rediseñar los <i>primers</i> .
Problemas con el molde	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
La concentración de Mg ²⁺ no es óptima	La concentración de Mg ²⁺ provista en la Master Mix qPCR 2.0 Sybr 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 <i>primers</i> no es óptimo	Revisar el diseño de los <i>primers</i> .
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 recomendados en el manual de instrucciones.