One-Step qRT-PCR Plex

Probe

PB-L
Productos
Bio-Lógicos ®

www.pb-l.com.ar

One-Step qRT-PCR Plex *(Probe)*

Cat. no. EA25

Presentaciones

Contenidos	EA25-01 25 µl × 100 reac	EA25-02 25 µl × 500 reac
One-Step qRT-PCR Plex (Probe) 2x	1,25 ml	5 × 1,25 ml
Mix de enzimas 25x	100 µl	500 µl
Rox 50x (Colorante de Referencia)	50 µl	250 µl
DTT 10mM (10x)	250 µl	1,25 ml
Agua ultrapura - Libre de nucleassas	1,5 ml	5 × 1,5 ml
Manual	1	1

Almacenamiento

El kit de One-Step qRT-PCR Plex *(Probe)* debe ser almacenado a -20ºC. Al descongelar los componentes del kit, homogenizarlos por inversión antes de utilizarlos. Para un uso frecuente, el kit puede ser almacenado a 2-8ºC por 3 meses. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelación/ descongelación.

Introducción

El Kit One-Step qRT-PCR Plex (*Probe*) está especialmente diseñado para realizar la reacción de transcripción reversa a partir de ARN purificado, seguido de una reacción de *Real-time* PCR cuantitativa basada en la detección de fluorescencia emitida por hidrolisis de la sonda específica, mediada por la actividad de exonucleólisis 5´-3´de la enzima Taq polimerasa. Este producto contiene todos los componentes necesarios para una reacción de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Solo se deben agregar los *primers,* la sonda y el molde (ARN).

El producto One-Step qRT-PCR (*Probe*) contiene una mezcla enzimática que incluye una enzima transcriptasa reversa optimizada (mayor termoestabilidad y actividad RNasa H-) y una Taq ADN polimerasa Hot Start *(con actividad exo 5´-3´)* con dos sistemas *Hot start* que eliminan la formación de dímeros de *primers* y permiten la utilización de un formato de reacción *multiplex* con varios juegos de *primers*/sondas simultáneamente. Por otro lado, incluye una mezcla de dNTPs/dUTP que permite eliminar contaminantes provenientes del arrastre de productos de amplificación, preincubando la reacción con la enzima UDG (*Uracil-DNA Glycosylase*) (No incluída en este kit, #cat EA17). La concentración de sus reactivos ha sido optimizada para obtener máxima sensibilidad y especificidad en un formato de reacción multiplex. Sin embargo, en algunas reacciones la concentración de Mg puede ser optimizada para mejorar la eficiencia del sistema.

Notas Importantes

1. Homogenizar la OneStep qRT-PCR Plex (*Probe*) suavemente por inversión o pipeta y centrifugar brevemente antes del uso. No usar vortex y evitar la generación de burbujas.
2. La pureza y homogeneidad de tamaño de los *primers* y la sonda es muy importante para obtener una alta especificidad en la reacción de qRT-PCR. Se recomienda usar *primers* y sondas purificados por PAGE u otro método superior.
3. Típicamente, los mejores resultados de amplificación se obtienen usando una concentración de *primers* de 0,3 – 0,5µM. Sin embargo, el usuario puede determinar la concentración óptima titulando cada *primer* en el rango de 0,15 µM a 1 µM.
4. La concentración de sonda debe ser optimizada para cada reacción, y para cada fluoróforo, generalmente variando entre 0,1 µM y 0,5 µM. Sin embargo, el usuario puede determinar la concentración óptima.
5. La calidad del ARN (pureza, integridad, ausencia de inhibidores) utilizado como molde de la reacción es determinante para obtener alta sensibilidad y eficiencia del sistema.
6. Evitar exponer las sondas de hidrolisis y el colorante de

referencia ROX a la luz directa, dado que esto podría afectar el rendimiento de la reacción

7. No utilizar *random primers* o *primers* poliT. Utilizar solo *primers* específicos.
8. Se recomienda agregar a la reacción de síntesis de cDNA un inhibidor de RNasa (RNase inhibitor, N° cat. IC01).

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

Protocolo

<1> Armado de la reacción de Real Time PCR

Nota: El colorante de referencia Rox 50x debe ser almacenado en oscuridad o protegido de la luz.

1. Descongelar la OneStep qRT-PCR Plex (*Probe*), el colorante de referencia ROX 50×, el molde, los *primers,* las sondas 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.

Componentes	25 µl	Concentración final
One-Step qRT-PCR Plex Probe 2x *[1]	12,5 µl	1×
Mix de enzimas 25x	1 µl	1x
DTT 10 mM (10x)	2 µl	1mM (1x)
Primer directo A	X µl	0,3 – 0,5 µM
Primer reverso A	X µl	0,3 - 0,5 µM
Sonda A *[2]	X µl	0,15 - 1 µM
Sonda B *[2]	X µl	0,15 - 1 µM
Primer directo B	X µl	0,3 - 0,5 µM
Primer reverso B	X µl	0,3 - 0,5 µM
Molde (ARN)*[3]	x µl	-ng o -pg
Colorante de referencia 50× ROX*[4]	x µl	Ver tabla de equipos
Agua ultrapura - Libre de nucleasas	c.s.p. 25 µl	-

*[1] La concentración final de $MgCl_2$ en la reacción es 5mM. Sin embargo, la reacción puede ser optimizada agregando $MgCl_2$ hasta una concentración 7,5 mM

*2 Se recomienda utilizar una concentración final del *primer dirA/ revA y primer dirB/revB (formato multiplex) de* 0,25 µM final. Sin embargo, se pueden usar concentraciones diferentes si la eficiencia de amplificación no es adecuada.
*3 Tener en cuenta las indicaciones en sección "Notas Importantes".
*4 La concentración óptima del colorante de referencia ROX frecuentemente utilizada 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, QuantStudio 3 / 5	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.

3. Cerrar los tubos y mezclar suavemente. Centrifugar brevemente para colectar cualquier líquido residual en las paredes y la tapa.
4. Programar el ciclado en el termociclador según la siguiente tabla:

<2> Programación del termociclador

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Síntesis de cDNA	1	37-50 °C[*5]	30 min	Retrotranscripción	No
Desnaturalización inicial	1	94 °C	5 min	Desnaturalización Inicial	No
Amplificación por PCR	45	94 °C	15 seg	Desnaturalización	No
		50-65 °C [*6]	15 seg	Hibridación	No
		72 °C	30 seg/ 500 nt	Extensión	Sí

*[5] La temperatura recomendada es 42°C

*[6] 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 de hibridación en el rango de 50 °C a 66 °C, teniendo en cuenta que la temperatura de hibridación debe ser 5 °C menor que el valor de Tm de los *primers*.

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

Guía de Problemas

1- Baja eficiencia de la reacción, no se detecta señal o hay una detección tardía de la señal.

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 *primers*/sonda no es la óptima	Ajustar la concentración de *primers* y/o sonda. Controlar la posible degradación de los mismos en un PAGE. Si es necesario, rediseñar los *primers* y/o sonda.
Problemas con el molde	Controlar la concentración, condiciones de almacenamiento, y la calidad del molde. Repetir la qRT-PCR usando nuevas diluciones o moldes patrones purificados con mayor calidad.
El diseño de los *primers* no es óptimo	Revisar el diseño de los *primers.*
El diseño de la sonda no es óptimo	Revisar el diseño de las sondas.

2- Alta fluorescencia en el control “Sin Molde”

Comentarios	**Sugerencias**
Contaminación de los reactivos	Descartar los componentes de la reacción y repetir la reacción con reactivos nuevos. Usar tips con filtro, guantes, no abrir las muestras amplificadas en el mismo lugar donde se prepara la reacción.

3- Generación de productos inespecíficos

Comentarios	**Sugerencias**
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 qRT-PCR es muy grande	La longitud de los productos no debería exceder los 500 pb. Para obtener resultados óptimos, el rango de tamaño de los productos debería estar entre 100 y 150 pb.

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

Comentarios	**Sugerencias**
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 qRT-PCR con las nuevas diluciones.
Escasa repetibilidad	Volumen de reacción muy pequeño. Evaluar el volumen recomendado en el manual de instrucciones.

5- Baja sensibilidad

Comentarios	**Sugerencias**
Diseño de *primers*	Rediseñar los *primers*.
Baja calidad del ARN	Confirmar cuantificación, pureza e integridad.

6- Error Bad ROX

Comentarios	**Sugerencias**
Demasiada cantidad de molde inicial	ARN o disminuir la cantidad de *primers* a 0,15 µM.
Baja señal del ROX	Aumentar la cantidad de ROX para que la concentración final en la reacción sea 2x.