MASTER MIX qPCR Plex

Probe

PB-L
Productos
Bio-Lógicos ®

www.pb-l.com.ar

Master mix qPCR Plex (*Probe*)

Cat. no. EA26

Presentaciones

Contenidos	EA2601 25 µl × 100 reac	EA2602 25 µl × 500 reac
Master Mix qPCR Plex 2x (*Probe*)	**1,25 ml**	**5 x 1,25 ml**
Rox 50x (Colorante de Referencia)	**50 µl**	**250 µl**
ddH_2O libre de DNasas y RNasas	**1,5 ml**	**5 x 1,5 ml**
Manual	**1**	**1**

Almacenamiento

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

Introducción

El Kit de Master Mix qPCR Plex (*Probe*) está especialmente diseñado para realizar Real-time PCR cuantitativa Multiplex 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. Esta mix contiene todos los componentes necesarios para una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real. Solo se debe agregar los *primers,* la sonda y el molde (ADN o ADNc). La Master Mix qPCR Plex (*Probe*) contiene una enzima *Taq* ADN polimerasa *(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 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 incluida en este kit, #cat EA17). La concentración de sus reactivos ha sido optimizada para obtener máxima sensibilidad y especificidad tanto en un formato de reacción multiplex. Sin embargo, en algunas reacciones la adición de Mg pude ser necesaria para optimizar la eficiencia del sistema.

Notas Importantes

1. Agitar la Master mix qPCR Plex (*Probe*) suavemente por inversión ó 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 qPCR. 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 µM. Sin embargo, el usuario puede determinar la concentración óptima titulando cada *primer* en el rango de 0,15 µM a 0,5 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. 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.
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

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 deben ser almacenados en oscuridad o protegidos de la luz.

1. Descongelar la Master mix qPCR Plex (*Probe*) (si se la almacenó a -20 °C, el colorante de referencia 50× ROX, el molde, los *primers,* las sondas y el $_{dd}H_2O$ 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	50 µl	25 µl	20 µl	Concentración final
Master Mix qPCR Plex 2x	25 µl	12,5 µl	10 µl	1×
Primer directo A (10 µM)	1,5 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,3 µM*[1]
Primer reverso A (10 µM)	1,5 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,3 µM*[1]
Sonda A/B (1 uM)	x µl	x µl	x µl	0,1-0,3 µM
Primer dir. A/B (10 µM)	1,5 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,3 µM*[2]
Primer rev. A/ B (10 µM)	1,5 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,3 µM*[2]
Molde (ADNg o ADNc)*[2]	x µl	x µl	x µl	-ng o -pg
Colorante de referencia 50× ROX*[3]	x µl	x µl	x µl	Ver tabla de equipos
ddH_2O libre de RNasas	c.s.p. 50 µl	c.s.p. 25 µl	c.s.p. 20 µl	-

*[1] Se recomienda utilizar una concentración final del *primer dirA/ revA y primer dirB/revB (formato multiplex) de* 0,3 µM final. Sin embargo, se pueden usar concentraciones diferentes si la eficiencia de amplificación no es adecuada.

*[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, 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

<2> Amplificación

Usualmente, los mejores resultados se obtienen utilizando un ciclado de qPCR en dos etapas (desnaturalización/*annealing*). 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 Tm bajos), se puede probar la qPCR en tres etapas.

qPCR en dos etapas

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
*Incubación UDG	1	37°C	10	1	No
Desnaturali-zación Inicial	1×	94°C	5 min	Desnaturali-zación Inicial	No
PCR	45×	92°C	15 seg	Desnaturali-zación	No
		60-65°C*[1]	30 seg/ 500 nt	Hibridación/ Extensión	Si

Esta etapa es opcional, debe agregarse la enzima UDG (no incluida en este kit. (Ver N° Cat. EA17 o EA19)

qPCR en tres etapas

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
*Incubación UDG	1	37°C	10	1	No
Desn. Inicial	1×	94°C	5 min	Desn. Inicial	No
PCR	45×	92°C	15 seg	Desnaturali-zación	No
		50-60°C*[2]	20 seg	Hibridación	No
		72°C	30 seg/ 500 nt	Extensión	Si

*[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 Tm de los *primers*. Sin embargo, la temperatura de hibridación puede ser optimizada entre 50-66 °C para mejorar la performance de la reacción. Se recomienda que la Tm de la sonda se 5 °C mayor a la de los primers.

*Esta etapa es opcional, debe agregarse la enzima UDG (no incluida en este kit. (Ver N° Cat EA17 o EA19)

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. 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 qPCR 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.
El producto de qPCR es muy grande	La longitud de los productos no debería exceder los 200 bp. Para obtener resultados óptimos, el rango de tamaño de los productos debería estar entre 100-150 pb.

2. Baja de linealidad en la reacción

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
Formación de dímeros de primers	Rediseñar los primers
Escasa reproducibilidad	Volumen de reacción muy pequeño. Probar los volúmenes recomendados en el manual de instrucciones.