



One Step qRT-PCR

Probe



**PB-L
Productos
Bio-Lógicos®**

www.pb-l.com.ar

One step qRT-PCR Probe

Cat. no. EA16

Presentaciones

Contenidos	EA16-01	EA16-02
	25 µl × 50 reac	25 µl × 100 reac
One step qRT-PCR Probe Master Mix 2x	625 ul	1,25 ul
Mix de enzimas 25X	50 ul	100 ul
ROX 50x (Colorante de Referencia)	25 µl	50 µl
DTT 100 mM (10X)	125 ul	250 ul
ddH ₂ O libre de DNasas y RNasas	1 ml	5 × 1 ml
Manual	1	1

Almacenamiento

El kit **One step qRT-PCR Probe** debe ser almacenado a -20°C (el reactiv ROX 50x debe ser almacenado protegido de la luz). Al descongelar los componente del kit, homogenizarlos antes de su uso. Para un uso frecuente, puede ser almacenado a 2-8°C por 3 meses. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelación/descongelación.

Introducción

El Kit **One step qRT-PCR Probe** está especialmente diseñado para realizar la síntesis de cDNA y la reacción de Real-time PCR mediante el uso de sondas de hidrolisis, en un solo paso. Esta mix contiene todos los componentes necesarios para una reacción de transcripción reversa a partir de ARN purificado, seguido de una PCR en tiempo real. Solo se deben agregar los *primers* y el molde (ARN purificado). La mezcla enzimática contiene una enzima

transcriptasa reversa optimizada (mayor termoestabilidad y actividad RNAsa H-) y una *Taq* ADN polimerasa Hot Start, para disminuir la formación de dímeros de *primers*. Por otro lado, incluye una mezcla de dNTPs/dUTP que permite la utilización de la enzima UDG (Uracil-DNA Glycosylase) para la eliminación de contaminantes provenientes del arrastre de productos de amplificación (se recomienda utilizar una enzima UDG termolábil). La concentración de sus reactivos ha sido optimizada para obtener máxima sensibilidad y especificidad.

Notas Importantes

1. Agitar cada componente suavemente por inversión y centrifugar brevemente antes del uso. **No usar vortex y evitar la generación de burbujas.**
2. La pureza y homogeneidad del 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.
3. Los mejores resultados de amplificación se obtienen usando una concentración de *primers* de 0,3- 0,5 μM . Sin embargo, el usuario puede determinar la concentración óptima titulando cada primer en el rango de 0,15 μM a 0,9 μM .
4. 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.
5. No utilice *random primers* ó *primers* poliT. Utilice solo *primers* específicos
6. Se recomienda agregar a la reacción de síntesis de cDNA un inhibidor de RNAsa (RNAsa inhibitor cat N° IC01)

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

Protocolo

<1> Armado de la reacción de One step qRT-PCR Probe

Nota: El colorante de referencia ROX 50x deben ser almacenados en oscuridad o protegidos de la luz.

1. Descongelar la **One step qRT-PCR Probe** (si se la almacenó a -20°C), el colorante de referencia 50x ROX, el molde, los *primers*, el DTT 10X 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	Concentración final
One step qRT-PCR Probe 2X	12,5 μl	1x
<i>Primer</i> directo (10 μM)	0,75 μl	0,3 μM^{*1}
<i>Primer</i> reverso (10 μM)	0,75 μl	0,3 μM^{*1}
Molde (ARN)	x μl	10 pg -100 ng ARN total
Colorante de referencia 50x ROX* ²	0,5 μl	1X
DTT 10X	2,5 μl	1X
Mix de enzimas 25X	1 μl	1X
ddH ₂ O libre de RNasas	c.s.p. 25 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*, pueden utilizarse concentraciones inferiores hasta 0,15 μM (Ver Notas Importantes).

*2 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

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 ciclo de qPCR.

<2> Programación del termociclador

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso	Recolección de señal
Síntesis de cDNA	1	50°C	30 min	Retrotranscripción	No
Desnaturalización Inicial	1x	94°C	5 min	Desnaturalización Inicial	No
PCR	45x	92°C	15 seg	Desnaturalización	No
		50-60°C*1	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 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*.

Guía de Problemas

1- 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 <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 nueva preparación de ARN.

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 <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
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.

5- Baja sensibilidad

Comentarios	Sugerencias
Diseño de <i>primers</i>	Rediseñar los <i>primers</i>
Baja calidad del ARN	Confirmar cuantificación, pureza e integridad
Preincubación del ARN con los <i>primers</i>	Realizar una preincubación del ARN con los <i>primers</i> a 65°C durante 5 min antes de agregar la mix de enzima

6- Error Bad ROX

Comentarios	Sugerencias
Demasiada cantidad de molde inicial	Realizar una nueva síntesis de cDNA con menos ARN, o disminuir la cantidad de <i>primers</i> hasta 0,15 uM