

REF KD0221R



Highway® One Step RT qPCR Multiplex

Para usar con sondas fluorescentes

Uso en investigación *In Vitro*

Manual de uso

Highway® One Step RT qPCR Multiplex (KD0221R), es una mezcla que contiene todos los componentes para amplificar un ARN de interés por Real Time PCR. El buffer de reacción ya contiene los dNTPs, MgCl₂ y aditivos necesarios para una óptima amplificación. El usuario solo deberá adicionar las sondas-primers específicos y el ARN templado. Este producto fue validado para la detección cualitativa del ARN de SARS CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo, con los primers de MacroGen: E, N y RNasaP como control de extracción. Para la extracción del material genético a partir de dichas muestras se empleó el Chemagic D360 de Perkin Elmer. El usuario podrá aplicar la Highway® One Step RT qPCR Multiplex con otros primers, aunque para ello deberá realizar la validación correspondiente.

Esta Master Mix esta formulada para emplearse **exclusivamente con sondas fluorescentes** y en un **formato multiplex**, permitiendo detectar hasta 3 genes en una misma reacción. **No requiere el uso de ROX.**

En un mismo tubo el ARN pasa a ADNc por acción de una Transcriptasa Reversa optimizada (mayor termoestabilidad, procesividad y actividad RNasaH-) y luego se amplifica ese ADNc por acción de una Taq ADN polimerasa (ultrapurificada y de alto rendimiento). Esto **facilita el pipeteo** por el usuario, minimizando los riesgos de contaminación y reduciendo los tiempos de reacción.

Durante el proceso de amplificación, la sonda se une específicamente a su secuencia blanco, ubicada entre los oligonucleótidos específicos (sentido y anti-sentido). El termociclador de Real Time detecta el aumento de la fluorescencia emitida por hidrólisis de la sonda específica, mediada por la actividad de exonucleasa 5' - 3' de la enzima Taq ADN polimerasa. Llega un momento en la reacción en el cual la señal de fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal

(umbral o “threshold”) y en este punto se determina el valor de Ct (ciclo umbral o “Threshold point”), con el cual se puede evaluar la cantidad relativa de ARN entre 2 o más muestras o la cantidad absoluta por comparación con una curva estándar con concentraciones conocidas de ARN.

Componentes del Kit

Se presenta en 2 versiones, para 100 reacciones (KD0221R-100) y para 500 reacciones (KD0221R-500)

Catálogo	KD0221R-100	KD0221R-500
Cantidad de reacciones	100	500
One Step RT qPCR Buffer Multiplex 2X, ml (M0221)	1	5
Mix de Enzimas 20X Multiplex, ml (ME0221)	0,1	0,5

Materiales necesarios NO provistos

- Primers y sondas fluorescentes específicos
- ARN templado
- Termociclador Real Time PCR
- Tubos o placas para Real Time PCR
- Microtubos de PCR
- Micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1000µl
- Tips con filtro (DNasas y RNasas free)

Condiciones de conservación

Una vez recibido conservar los componentes de Highway® One Step RT qPCR Multiplex (KD0221R) en freezer a -20°C.

! **IMPORTANTE** Durante **TODO** el proceso de preparación del cocktail de reacción, mantener los componentes en hielo.

- Se recomienda utilizar primers purificados por HPLC o PAGE.
- Las sondas fluorescentes deben protegerse de la luz.
- Se sugiere preparar un pool con los primers y sondas según lo indicado en la tabla 1.
- Emplear guantes y cambiárselos seguido.
- Designar un área en el laboratorio para trabajar con ARN y emplear micropipetas solo para este fin y tips con filtro.
- No abrir los tubos o placas una vez finalizada la amplificación.

Protocolo

Descongelar el One Step RT qPCR Buffer Multiplex 2X (M0221) y el agua ultrapura (A0103) en caso de ser necesaria (no provista). **Mantener todos los componentes del kit en hielo durante la preparación de la Master Mix.**

Tabla 1.

Componente	Volumen para 1 reacción	Concentración Final
One Step RT qPCR Buffer Multiplex 2X (M0221) Highway	10 μ l	1X
Mix de Enzimas 20X, ml (ME0221) Highway	1 μ l	1X
Pool de primers y sondas (20X)	1 μ l	1X
ARN Templado	variable	100 ng-10 pg*
Agua ultrapura (A0103) Highway	c.s.p 20 μ l	

*recomendado

1. Agitar por inversión el One Step RT qPCR Buffer Multiplex 2X y la Mix de enzimas 20X. **No vortexear**. Dar un pulso en la microcentrífuga.
2. Preparar la Master Mix en un microtubo de PCR, adicionando todos los componentes excepto el ARN templado. Homogeneizar con la pipeta (up/down) cuidando de no hacer burbujas. **No usar vortex**. Dar un pulso en la microcentrífuga.
3. Alicuotar la Mix en microtubos o placa de 96 pocillos para qPCR.
4. Agregar el ARN templado (o agua en el caso del control sin templado).
5. Centrifugar los tubos o las placas durante 1 minuto a 2500 rpm para eliminar burbujas.
6. Configurar el equipo Real Time según la siguiente tabla:

Tabla 2.

Paso	Temperatura	Tiempos	Número de ciclos
Retrotranscripción	55°C	10 minutos	1
Desnaturalización inicial	95°C	1 minuto	1
Desnaturalización en ciclo	95°C	15 segundos	40 - 45 ciclos
Elongación y lectura	60°C	30 segundos (+ lectura)*	

*Por ejemplo para equipos de la línea ABI usar 30+30 segundos



Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas

Una vez recibido conservar a -20°C

Inbio Highway S.A.

Serrano 1414 (7000) Tandil | Prov. Bs. As. | Argentina

Tel. +54 249 4420193

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar

Directora técnica: Bioq. A. Carolina Prokopiuk

PRODUCIDO EN ARGENTINA 

