

## INSTRUCCIONES PARA KIT HEQC-ONE-STEP

Kit-HEQC-One-Step (V.0)

### SÓLO PARA INVESTIGACIÓN

**Código del producto:** HEQC-ONE-STEP

**Referencia:** HEOS-150

**Número de reacciones:** 150

### INDICACIONES Y USO

HEQC-ONE-STEP contiene los reactivos y controles para realizar un RT-qPCR test, destinado a evaluar la calidad de la muestra extraída, para la detección de RNA obtenido a partir de células humanas. Se puede emplear en extractos de RNA obtenidos a partir de torundas.

### PRINCIPIOS DEL TEST

El kit incluye reactivos para la amplificación y detección del gen *GUSB* humano mediante RT y PCR en un solo paso mediante cuantitativa a tiempo real.

### DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO HEQC ONE-STEP

El kit HEQC-ONE-STEP es un nuevo diseño de RT-qPCR que permite realizar un control de reacción (detección de los niveles de ARNm del gen *GUSB* humano a partir de RNA). HEQC-ONE-STEP permite analizar la calidad de las muestras y su amplificación/detección mediante RT-qPCR. Permite verificar la eficacia de la muestra y la ausencia de inhibidores en la reacción de PCR.

El kit incluye todos los reactivos requeridos para la síntesis de cDNA, la amplificación y detección por PCR a tiempo real, así como un control de RNA. El kit no incluye los componentes para aislar el RNA.

**El kit debe ser almacenado a -20 °C. Evitar ciclos de congelaciones/descongelaciones y proteger de la luz.**

### COMPONENTES

HEQC-ONE-STEP incluye los siguientes componentes:

- GUS B MIX (3 tubos). Cada tubo es para 50 reacciones.
- GUS B control (1 tubo)

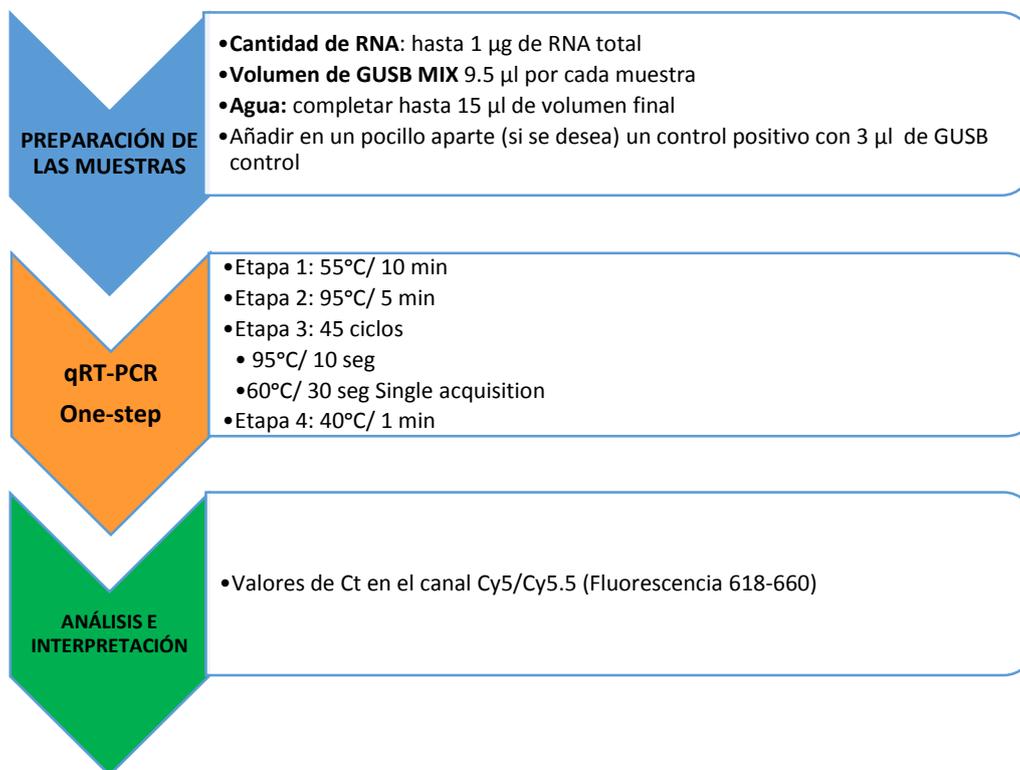
### MATERIAL REQUERIDO NO PROPORCIONADO

- **Equipamiento:**
  - Equipo de qPCR LightCycler® 480 (Roche).
  - Cabina para PCR.
  - Pipetas para volúmenes entre 0.2, 20 y 200 µl (aconsejable una 0.5 a 10, otra de 2-20 y otra de 10-100 o hasta 200).
  - Centrífuga para tubos de 1.5 ml y placas multipocillo.
- **Consumibles**
  - Placas de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White (Roche)
  - Films adhesivos para placas de 96 pocillos aptas para qPCR.
  - Puntas con filtro libres de DNAsas y RNAsas.
  - Agua miliQ libre de RNAsas.
  - Guantes.

## LIMITACIONES DEL ENSAYO

El kit utiliza RNA purificado como muestra para el ensayo.

## VISTA GENERAL DEL PROTOCOLO



### PROTOCOLO HEQC-ONE-STEP

- Tomar las precauciones requeridas para manipular RNA y material pre-PCR.
- Antes de empezar las reacciones agitar mediante vórtex y centrifugar previamente a abrir los tubos.

#### Protocolo:

1. Dispensar 9.5 µl del reactivo GUS B MIX.
2. Añadir RNA extraído en una cantidad inferior a 1 µg.
3. Completar hasta 15 µl con agua libre de RNAsa.
4. Sellar la placa con el film adhesivo.
5. Centrifugar la placa durante 10 segundos e insertarla en el instrumento de qPCR.

#### Programación de adquisición LightCycler® 480:

- Detection Format: 3 Color Hydrolysis Probe
- Filter:
  - FAM (Fluorescencia 465-510)
  - VIC/HEX/Yellow555 (Fluorescencia 533-580)
  - Cy5/Cy5.5 (Fluorescencia 618-660)
- Reaction Volume: 15 µl

### Programa One-Step

Target(°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate(°C/S)	Cycles
55°C	None	00:10:00	4.40	1
95°C	None	00:01:00	4.40	1
95°C	None	00:00:10	4.40	45
60°C	Single	00:30:00 (*)	2.20	
40°C	None	00:01:00	2.20	1

(\*) se puede aumentar hasta 1 min en equipos de Applied Biosystems

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- HEQC-ONE-STEP debe de ser utilizado por personal entrenado y experimentado para evitar resultados erróneos.
- Emplear zonas separadas para la preparación de las muestras y los controles con el fin de evitar falsos positivos. Las muestras y reactivos deben de manipularse en una cabina de flujo laminar.
- Las muestras deben de tratarse como si fueran infecciosas de acuerdo a las normas y procedimientos de bioseguridad.
- Utilizar equipos de protección para manejar muestras potencialmente infecciosas siguiendo las normas de bioseguridad.
- Utilizar siempre puntas con filtro y libres de DNAsas y RNAsas.

#### ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO

Chequear que la señal Cy5 esté presente en todas las muestras. El valor de Cq de esta señal debe de ser inferior a 30. Si es superior a 35 la muestra no se puede analizar y se recomienda repetir el ensayo y/o la extracción de la muestra.