

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LOS
TERMOCICLADORES DE PCR EN TIEMPO REAL:
*STEP-ONE-PLUS Y QUANTSTUDIO 12K FLEX de Applied
Biosystems***

INDICE

I. Introducción

II. Objetivo General del Manual

III. Políticas de operación, normas y lineamientos

IV. Protocolos

1. Protocolo para ensayos de Discriminación Alélica (Taqman) ó Punto Final

1.1 Recomendaciones para obtener una buena lectura de fluorescencia

2. Protocolo para ensayos de PCR en Tiempo Real en el equipo StepOnePlus

3. Protocolo para ensayos de genotipificación en el QuantStudio 12K Flex PCR Real-Time System

V. Registros

I. Introducción

El laboratorio de Biología Molecular, cuenta con infraestructura tecnológica de última generación producida por Applied Biosystems, una de las compañías líderes en el desarrollo y manufactura de equipos de alta tecnología para su aplicación en genética y biología molecular; y personal altamente capacitado para ofrecer a la comunidad científica de las Instituciones públicas y privadas, las técnicas de análisis de ácidos nucleicos de mayor demanda en la actualidad (Genotipificación, Análisis de SNP's, Expresión Génica y PCR de Tiempo Real), dirigidas especialmente a las investigaciones en el campo de las ciencias biomédicas y de la salud.

El Laboratorio cuenta con capacidad para análisis de PCR en Tiempo Real, utilizando los equipos StepOnePlus y el QuantStudio 12K Flex que permiten llevar a cabo experimentos de análisis de expresión génica y de genotipificación basados en la detección de moléculas fluorescentes. Esta tecnología resulta útil para estudios orientados al análisis de genotipos o expresión de un grupo pequeño de genes en un gran número de muestras, por ejemplo, en el caso de la validación de resultados obtenidos mediante microarreglos, así como en la asociación de un polimorfismo específico con alguna enfermedad.

El Laboratorio de Biología Molecular dispone actualmente de los siguientes equipos relacionados con el análisis de ácidos nucleicos:

1. Equipo de PCR en Tiempo Real StepOnePlus Fast, que realiza diversos ensayos principalmente expresión génica, discriminación alélica y cuantificación viral absoluta. Como estrategias de marcaje utiliza sondas TaqMan o SYBER Green. Con capacidad de análisis de hasta 96 muestras simultáneas. (Applied Biosystem).
2. Equipo de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex, que realiza ensayos principalmente de expresión génica y genotipificación mediante discriminación alélica. También utiliza sondas TaqMan o SYBER Green y posee una gran capacidad de análisis de hasta 12,000 muestras simultáneas en una sola corrida (Applied Biosystem).
3. Unidad automatizada de Fluidos Biomek Liquid Handler que realiza funciones de preparación de reacciones en placas para su lectura en los equipos, lo que potencia la capacidad de preparación y procesamiento de muestras en el laboratorio (Beckman Coulter).
4. Tres termocicladores de 96 pozos, Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Actualmente el Laboratorio de Biología Molecular cuenta con un Responsable y un Técnico de laboratorio.

II. Objetivo General del Manual

El objetivo del manual es contar con un documento en el que se describan las técnicas para el desarrollo de los protocolos del Laboratorio de Biología Molecular, que sirvan de guía o referencia al personal que labora en esta área, así como de los usuarios del servicio de las instituciones que conforman el Consorcio o de otras instituciones públicas o privadas y sirvan también para establecer los mecanismos y lineamientos necesarios para que la operación se realice en estricto apego a la normatividad en la materia, coadyuvando al cumplimiento de los objetivos institucionales.

III. Políticas, normas y lineamientos para el uso de los equipos StepOnePlus y QuantStudio 12K Flex Real -Time PCR Systems

3.1.1. Solo se le permitirá usar el equipo a personas que tengan la capacitación básica para el manejo del mismo.

3.1.2 Registrarse en la bitácora al realizar la lectura de placas. En el rubro “usuario” se deberá anotar el nombre del usuario (técnicos, estancias, servicio social, etc) que realizará la lectura de los datos y además el nombre del investigador responsable.

3.1.3 Antes de utilizar el equipo revisar la bitácora para asegurarse de no empalmar sus corridas con las corridas en tiempo real de otros usuarios.

3.1.4 En el caso de corridas de tiempo real el usuario se anotará con 24 horas de anticipación, además anotará el horario durante el cual ocupará el equipo y no deberá exceder ese tiempo.

3.1.5 Para hacer más eficiente el proceso, en corridas de tiempo real sólo se permite un hold de 4°C durante 10 min., si al término de este tiempo no es retirada la placa, será desechada y cualquier usuario podrá utilizar el equipo.

3.1.6 El usuario deberá hacer la lectura de tiempo real y/o punto final, guardar los archivos y subir los resultados a su folder de red sin hacer un análisis detallado de los datos obtenidos.

3.1.7 Antes de apagar el equipo verificar que NO quede abierto

3.1.8 Asegurarse de no dejar placas en el equipo

3.1.9 Apagar el equipo de Tiempo Real (sólo el instrumento, dejar encendida la computadora) al terminar lectura de las placas.

3.1.10 Si detecta cualquier anomalía en el equipo reportarlo inmediatamente.

3.1.11 Para ensayos de PCR Tiempo Real y TaqMan, el usuario debe manipular todos los reactivos y la placa con guantes, adicionalmente se debe evitar que la placa y reactivos tengan contacto con áreas contaminadas, con polvo o talco.

3.1.12 En este manual no se puede precisar los reactivos, volúmenes o número de réplicas; los parámetros de cada ensayo se especifican con el usuario antes de realizar la corrida.

IV. Protocolos

1. Descripción del Protocolo para ensayo de Discriminación Alélica (Taqman) o Punto Final

Preparación de la muestra (2 hrs. 20 min.)

➤ Limpiar con etanol el área de trabajo												
➤ Colocar PCR Master Mix en hielo, descongelar la sonda Taqman y colocarla en hielo (preferentemente cubierta con aluminio). Durante este lapso de tiempo rotular perfectamente la placa y encender el termociclador.												
➤ Hacer la mezcla de reacción tomando en consideración la concentración de la sonda: <table border="1"><tr><td>Reactivos</td><td>Sonda 20X</td><td>Sonda 40X</td></tr><tr><td>Universal PCR Master Mix</td><td>225.0µL</td><td>225.0µL</td></tr><tr><td>Sonda</td><td>11.0µL</td><td>5.5µL</td></tr><tr><td>H2O grado Biol Mol</td><td>295.0µL</td><td>295.5µL</td></tr></table>	Reactivos	Sonda 20X	Sonda 40X	Universal PCR Master Mix	225.0µL	225.0µL	Sonda	11.0µL	5.5µL	H2O grado Biol Mol	295.0µL	295.5µL
Reactivos	Sonda 20X	Sonda 40X										
Universal PCR Master Mix	225.0µL	225.0µL										
Sonda	11.0µL	5.5µL										
H2O grado Biol Mol	295.0µL	295.5µL										
➤ Mezclar los reactivos 4 veces por pipeteo y dar un pulso en la microfuga												
➤ Alicuotar 61 µL de la mezcla de reacción en tubos de 8 tiras												
➤ Dispensar 5 µL de la mezcla de reacción a cada muestra con una pipeta multicanal y mezclar por pipeteo												
➤ Sellar la placa con una cubierta óptica												
➤ Colocar la placa en la centrífuga de microplacas y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.												
➤ Colocar un Pad sobre la placa y termociclar en el equipo StepOnePlus siguiendo el programa para Taqman: 1 Hold de 95°C por 10:00 min. 40 ciclos de 92°C por 15 seg. 60°C por 1:00 min 1 Hold de 4°C												
Procesamiento de la muestra dentro del equipo (10-15 min)												
➤ Encender la computadora y posteriormente el equipo												
➤ Abrir el programa StepOnePlus V2.2.2 y seleccionar la aplicación <i>Allelic Discrimination</i>												
➤ Seleccionar la opción <i>set up</i> ; ingresar el nombre de las muestras, seleccionar marcadores y detectores correspondientes.												
➤ Seleccionar la opción <i>instrument</i> y pulsar <i>connect</i> , posteriormente pulsar <i>open/close</i> y colocar la placa con las muestras, pulsar nuevamente <i>open/close</i>												
➤ Pulsar la opción <i>Post Read</i> y analizar resultados												
➤ Seleccionar la opción <i>instrument</i> y pulsar <i>open/close</i> , retirar la placa con las muestras, pulsar nuevamente <i>open/close</i> .												
➤ Dentro de la opción <i>Instrument</i> pulsar <i>disconnect</i> y apagar el equipo.												
➤ Guardar el ensayo en la carpeta del usuario correspondiente, (disco duro), analizar los resultados y colocar los resultados en el folder del usuario. Apagar el equipo y guardar la placa 4°C. El término de este paso se considera el final del ensayo.												
➤ Entrega de resultados												
Termina el proceso												

1.1 Recomendaciones para obtener una buena lectura de fluorescencia

- 1.1.1 Usar guantes de nitrilo al manejar las placas
- 1.1.2 Traer las placas cubiertas con papel aluminio
- 1.1.3 No colocar las placas en superficies sin protección y que se puede contaminar el bloque y obtener una mala lectura.
- 1.1.4 Utilizar pad en la placa si se va a correr un ensayo de Tiempo Real y retirarlo antes de hacer la lectura de Punto Final.
- 1.1.5 Evitar al máximo tener contacto con la película óptica que cubre a la placa

2. Descripción del protocolo para ensayo de PCR en Tiempo Real en el equipo StepOnePlus.

Preparación de la muestra (20 – 30 min)

➤ Limpiar con etanol el área de trabajo
➤ Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, durante este lapso de tiempo rotular perfectamente la placa y encender el termociclador. Cubrir con aluminio los reactivos que contengan fluorocromos y mantener todos los reactivos en hielo.
➤ Preparar la mezcla de reacción tomando en consideración la concentración de la sonda, número de muestras y réplicas, con roles endógenos, controles negativos y positivos, etc.
➤ Mezclar los reactivos 4 veces por pipeteo y dar un pulso en la microfuga
➤ Dispensar la muestra a cada pozo de la placa y adicionar la mezcla de reacción, mezclar por pipeteo.
➤ Sellar la placa con una cubierta óptica.
➤ Colocar la placa en la centrífuga de microplacas y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.
➤ Colocar un Pad sobre la placa y termociclar en el equipo StepOnePlus Real Time PCR System Termino del proceso

Procesamiento de la muestra dentro del equipo (2 hrs 10 min.)

➤ Encender el equipo StepOnePlus Real Time PCR System y abrir el software StepOnePlus V2.2.2, seleccionar la aplicación "Absolute Quantification" o "Relative Quantification" según sea el tipo de experimento.
➤ Seleccionar opción set up; ingresar el nombre de muestras, seleccionar marcadores y detectores correspondientes, estándares, controles endógenos, controles positivos y negativos, etc.
➤ En la opción instrument, establecer parámetros de volumen y termociclado según el tipo de ensayo.
➤ Guardar el ensayo en la carpeta del usuario (disco duro).
➤ Seleccionar la opción Instrument y pulsar connect, posteriormente pulsar open/close y colocar la placa con el pad, pulsar nuevamente open/ close
➤ Seleccionar el ícono de corrida "start"
➤ Al término de la corrida sacar la placa, retirar el pad e introducir la placa nuevamente
➤ Pulsar la opción Post Read y analizar los resultados, guardados en la carpeta de red correspondiente.
➤ Seleccionar la opción instrument y pulsar open/close, retirar la placa con las muestras, pulsar nuevamente open/close

➤ Dentro de la opción instrument pulsar disconnect y apagar el equipo. Guardar la placa 4°C
➤ El término de este paso se considera el final del ensayo Termino del proceso

3. Descripción del protocolo para ensayo de genotipificación en el QuantStudio 12K Flex Preparación de la muestra (20 – 30 min)

➤ Limpiar el área de trabajo con etanol al 70%
➤ Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, durante este lapso de tiempo rotular perfectamente la placa y encender el termociclador. Cubrir con aluminio los reactivos que contengan fluorocromos y mantener todos los reactivos en hielo.
➤ Dispensar 4 microlitros de ADN a 50 ng/ul y 4 microlitros de master mix en placa de 96-pozos, mezclar bien y dar un pulso de centrifuga (colocar las muestras según el orden descrito en su plantilla de excell con extension .cvs).
➤ Sellar la placa con film transparente y entregar en la RAI junto con el archivo de excell (.cvs) donde esta especificado el orden de sus muestras y el archivo con extension .spf que bajan de la página de Applied y que corresponde a su ensayo.
➤ Dispensar la mezcla de muestra y master mix a cada pozo de la placa de 384-pozos.
➤ Sellar la placa con una cubierta de aluminio.
➤ Colocar la placa en la centrífuga de microplacas y dar un pulso. Asegurarse de eliminar las burbujas en la mezcla de reacción.
➤ Integrar en el software del accufill el nombre de las muestras (archivo con extensión .cvs) y el ensayo (archivo con extension .spf).
➤ Colocar la placa de 384-pozos en el accufill junto con las puntas y la placa de arreglo abierto.
➤ Seleccionar las características del ensayo de los menús y proceder al cargado automatico de las muestras
➤ Colocar la tapa óptica del arreglo abierto y sellarla durante 15 segundos con la prensa
➤ Rellenar el arreglo abierto con el fluido de inmersión sin formar burbujas y sellarlo con el tornillo que trae el ensayo.
➤ Limpiar el arreglo abierto con KimWipes y etanol al 70% y colocar la placa del arreglo abierto en el equipo QuantStudio 12K Flex Real Time PCR System.
Procesamiento de la muestra dentro del equipo (4 hrs)
➤ Encender el equipo QuantStudio 12K Flex Real Time PCR System y abrir el software Quant Studio V1.2 e importar el archivo integrado en el accufill con el ensayo y el nombre de las muestras (Loaded-nombre del archivo.spf) e iniciar la corrida.
➤ Al terminar la corrida, abrir el archivo con extension .eds y exportar las imagenes QC, las graficas en PDF y los datos del ensayo en excel a la carpeta el usuario creada previamente en el disco duro.
➤ Copiar la carpeta del usuario a un CD y proceder a la entrega de resultados.
➤ Seleccionar la opción instrument y pulsar open/close, retirar la placa con las muestras, pulsar nuevamente open/close
➤ Dentro de la opción instrument pulsar disconnect y apagar el equipo. Guardar la placa 4°C
➤ El término de este paso se considera el final del ensayo Termino del proceso

Documentos	Código (cuando aplique)
Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System, Maintenance and Troubleshooting Guide.	Proveedor Applied Biosystems
Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, Maintenance and Troubleshooting Guide.	Proveedor Applied Biosystems

V. Registros

Registros	Tiempo de conservación	Responsable de conservarlo	Código de registro o identificación única
Resultados	2 meses	Laboratorio de Biología Molecular	No aplica
Bitácora	1 año	Laboratorio de Biología Molecular	No aplica