

CannaSEX qPCR



Kit para la determinación del dimorfismo sexual de *Cannabis sativa* mediante qPCR



200 Reacciones + Controles (Cat. No. CT0001)



Gentech S.A.S. Carrera 46 No 48C Sur 40
Int.102. Segundo piso. Ciudadela Real. Envigado,
Antioquia, Colombia

Introducción

Los programas de selección asistida por marcadores se han posicionado como herramientas de alto valor en esquemas de mejora productiva para sistemas agronómicos y pecuarios. La implementación de tecnologías genómicas aplicadas a la selección de individuos que poseen ciertas características de interés ha permitido la optimización de los programas de selección reduciendo principalmente los intervalos tiempo y costos requeridos para alcanzar los objetivos de mejora y producción; estas tecnologías poseen cualidades y claras ventajas respecto a los marcadores morfológicos, bioquímicos y citológicos dada su abundancia, distribución en el genoma, independencia de la etapa de desarrollo y factores ambientales. El dimorfismo sexual en *Cannabis sativa* es una característica de vital relevancia y objeto de selección en la industria, dado que es en la flor de las plantas femeninas donde se produce la mayor proporción de compuestos de interés y si las flores son polinizadas por plantas masculinas producirán semillas que afectaran las proporciones de terpenos, THC y CBD afectando fuertemente el rendimiento, calidad y capacidad productiva.

Recientemente, con la legalización del cultivo y uso de la flor de cannabis, diferentes marcadores moleculares han sido empleados para investigar su diversidad, origen geográfico, caracterización de variedades, mapas de ligamiento genético y determinación del sexo. Discriminar entre plantas de cannabis masculinas y femeninas en una etapa temprana es altamente útil en esquemas de producción masiva, dado que la discriminación morfológica del género de las plantas se puede realizar con precisión en etapas avanzadas del desarrollo lo que implica periodos prolongados de tiempo y gastos en nutrientes y espacio que pueden arrojar resultados negativos a nivel productivo. En los últimos años diferentes marcadores del ADN predictivos del género en etapas de desarrollo temprano han sido identificados, validados y verificados para dicha determinación lo que ha permitido su implementación esquemas de selección dirigida a plantas femeninas con resultados de alta capacidad predictiva y confiabilidad. CannaSEX es un conjunto de pruebas basada en la amplificación de ácidos nucleicos específicos para individuos masculinos en plantas de *Cannabis sativa* en dos presentaciones: En tiempo real (qPCR) utilizando un marcador genético y convencional utilizando dos marcadores para ser revelados en electroforesis de gel de agarosa.

Principio

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) funciona permitiendo la amplificación de un fragmento de interés del ADN total de un microorganismo, patógeno u organismo particular. Inicialmente se parte de una muestra de ADN purificado y posteriormente es amplificada sucesivamente en una reacción de PCR.

En el caso de este kit, la amplificación es detectada mediante el uso de agentes fluorescentes que reportan dicha amplificación la cual puede ser captada en tiempo real únicamente cuando hay presencia de las secuencias específicas asociadas al genotipo masculino de plantas de *Cannabis sativa*.

En este kit, usted cuenta con todos los componentes necesarios para llevar a cabo las reacciones. Adicionalmente, cuenta con un control positivo (CP) que permite verificar el funcionamiento de las reacciones de PCR y sus componentes.

CannaSEX qPCR

Este kit emplea una combinación de agentes fluorescentes que reportan en el canal verde de detección en su termociclador. A saber, estas agentes son:

Canal	Detección
Verde Excitación (nM) 470±10 Detección (nm) 510±5	SYBR GREEN FAM Fluorescein EvaGreen® Alexa Fluor 488

El presente kit fue validado en la plataforma Rotor-Gene Q (Qiagen), pero su desempeño ha sido confirmado en los sistemas de PCR en tiempo real X960 real-time PCR (HealForce), Gentier 96 (Nanobi) y Quantgene 9600 (Bioer)

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN sugerimos muestras de hoja utilizando el kit EZ-10 Spin Column Plant Genomic DNA (BioBasic) plataforma con la cual se realizó la extracción de ADN para la validación de la prueba. Sin embargo, el procedimiento de extracción se puede adelantar con diferentes plataformas comerciales que garanticen la extracción del ADN de plantas de calidad y buena concentración.

Contenidos del Kit

Componente	Cantidad (Cat. No. PF002)
Solución A*	1 vial (1.3 ml)
Solución C ⁺	1 vial (100 ul)
Solución C [‡]	1 vial (100 ul)
Agua Libre de Nucleasas (NTC)	1 vial (1.2 ml)

* Master Mix: Contiene los componentes para adelantar la qPCR (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂)

+Canna Mix: marcadores dirigidos a la discriminación masculina de *cannabis sativa* .

‡ Control positivo: ADN planta masculina verificado por secuenciación.

Si va a realizar alícuotas del sistema CannaSEX, asegúrese de evitar la exposición prolongada a la luz y disponga la alícuota en viales color ámbar para evitar alteraciones en los agentes fluorescentes que termine afectando el sistema de emisión de la mezcla. Evite ciclos de congelación y descongelación (>8) tanto para la solución stock o alícuotas de este componente.

Materiales a ser proporcionados por el usuario

Adicional a los materiales proporcionados en el kit, usted necesitará los siguientes materiales que no se encuentran incluidos. Algunos de estos insumos pueden ser adquiridos a través de nuestra compañía.

CannaSEX qPCR

Conste la sección de Información sobre Órdenes al final de este manual. Para facilitar su gestión de aprovisionamiento, marque las casillas que se muestran al lado de cada insumo necesario.

Usted requerirá de: micro pipetas , puntas para micropipeta con barrera , vórtex , termociclador en tiempo real , mini centrífuga , estación de PCR o área para trabajo de PCR , baño de hielo o estación de frío , gradillas , tubos de 1,5-2,0 mL .

Adicionalmente, usted requerirá realizar extracción de ADN a partir de sus muestras, considere un sistema de extracción por columnas, perlas magnéticas o a partir de tarjetas FTA.

Por su parte, todo trabajo en el laboratorio implica que el personal operativo debe contar con implementos de protección personal como: bata , guantes y lentes protectores , guantes y lentes protectores .

Protocolo de Uso

Puntos Importantes antes de Empezar

- Lea por completo las notas importantes mencionadas en este manual
- Realice el protocolo tan rápido como sea posible. El ADN es una molécula inestable y puede ser susceptible a degradación o alteraciones en el tiempo.
- Siempre descontamine sus superficies antes de iniciar el protocolo
- Asegúrese de que los productos se encuentran en buen estado antes de empezar.

Procedimiento

1. Pipetee los siguientes reactivos en un tubo de 1,5mL. El volumen será correspondiente al número de reacciones que utilizará, se recomienda considerar una reacción adicional al número de pruebas a analizar:

Componente	1 reacción	10 reacciones
Solución A	10µl	100µl
Solución B	1µl	10µl
Agua Libre Nucleasas (NTC)	7µl	70µl
Volumen Total	18µl	180µl

2. Dispense la mezcla (18 µl) en los tubos o platos de reacción (grado óptico). Utilice un tubo por cada muestra a procesar e incluya un tubo para cada control, positivo y negativo.

CannaSEX qPCR

- Dispense en cada uno de los tubos 2 μ L de la muestra de ADN a probar. En el caso de los controles incluya 2 μ L del Control Positivo (**Solución C**) y 2 μ L Agua Libre de Nucleasas (NTC) al control negativo, respectivamente.
- Cierre los tubos con sus tapas o película grado óptico en el caso de emplear platos.
- Configure su termociclador en el canal verde para el agente fluorescente de este kit y la etapa donde tendrá lugar la detección  :
- Configure el termociclador de acuerdo con las condiciones mostradas a continuación:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Initial Hold	95° C	10 Min	1
Hold	95° C	15 Seg	35
Alineamiento	58° C	40 Seg	
Extension	72° C	30 Seg 	

Análisis de datos e Interpretación de resultados

Para que el ensayo sea válido, el control positivo debe mostrar una señal con un C_T entre 20 y 30 ciclos. Adicionalmente, el control negativo, no deberá registrar amplificación o un valor de $C_t > 35$ en caso de presentarse, en algunas plataformas pueden evidenciarse un curva atípica sobrepasando en el ciclo umbral de detección (C_t)

Comportamiento de los controles de la prueba:

Rango de C_t (Cycle Thershold)	
Control Positivo (CP)	20 – 30
Control Negativo	No amplificación o $C_t > 33$
Muestras positivas	$C_t \leq 30$

* Los valores de C_t pueden variar por ± 2 ciclos al ser empleados en diferentes instrumentos de PCR en tiempo rea

Los resultados y su interpretación son mostrados a continuación:

Resultado	Canal Verde	Control Positivo	Control Negativo
Positivo	+	+	-

CannaSEX qPCR

Negativo	-	+	-
Indeterminado	+/-	-	-
	+/-	-	+
	+	+	+
	+/-	+	-

Notas Importantes

Para el uso adecuado de este kit, los usuarios deben tener en cuenta: usar siempre consumibles y plásticos libres de nucleasas, almacenar y manipular separadamente muestras y materiales que puedan contener material genético de plantas, descongelar siempre sobre hielo o en una estación de frío los reactivos a ser utilizados, homogeneizar bien los reactivos a ser utilizados luego de descongelarse por completo y no utilizar los componentes del kit luego de su fecha de vencimiento/expiration.

Asegúrese de dispensar las muestras en tubos con componentes de calidad óptica según su termociclador.

Por su parte, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones sobre el uso de los controles:

Control Positivo

Incluya siempre al menos una reacción de control positivo en su conjunto de PCR. Este control permite comprobar la funcionalidad de los reactivos de detección y la correcta manipulación de los reactivos empleados.

Control Negativo

Incluya siempre al menos una reacción de control negativo sin plantilla (*Non Template Control* -NTC- por sus siglas en inglés) en su conjunto de PCR. Este control permite determinar que no haya ocurrido contaminación de los reactivos o de la reacción de PCR.

Uso Previsto

El kit permite la discriminación de individuos masculinos en plantas de *Cannabis sativa* a partir de ADn purificado de hoja. El protocolo de extracción de ácidos nucleicos a ser empleado debe ser determinado por el investigador de acuerdo con el tipo de matriz. El objetivo de este ensayo molecular no es prevenir, curar, tratar o coadyuvar en el tratamiento de ninguna enfermedad animal o humana. Este kit tampoco tiene el objetivo de dar un diagnóstico sobre una enfermedad. Se define para uso exclusivo para Investigación (RUO por siglas en inglés *Research Use Only*) en la industria del Cannabis.

CannaSEX qPCR

Almacenamiento

Los kits de la línea CannaTECH de Gentech Biosciences deben ser transportados en hielo seco. Al llegar a su institución o centro de investigación, deben ser almacenados entre -35°C y -18°C, serán estables a dicha temperatura hasta la fecha de vencimiento/expiración del kit.

Evite ciclos de congelación y descongelado de los reactivos del kit (>6). Estos ciclos pueden perjudicar la integridad de los componentes. Si no utilizará el kit de inmediato o bajo número de muestras serán procesadas, realice alícuotas de los reactivos conforme sea necesario y preserve las alícuotas en las condiciones anteriormente mencionadas y características particulares de cada componente.

Control de Calidad

La fabricación de nuestros reactivos se realiza en instalaciones adecuadas para el procesamiento de insumos en biología molecular. Las bodegas de almacenamiento se encuentran certificadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia – INVIMA y nuestros laboratorios de servicio han sido reconocidos por el Instituto Colombiano Agropecuario de Colombia (ICA). El personal involucrado en producción se encuentra certificado en Buenas Prácticas de Laboratorio y Norma ISO 17025.

Información de Seguridad

Cuando trabaje con reactivos químicos o sustancias biológicas debe contar siempre con protección adecuada. Utilice siempre y adecuadamente sus elementos de protección personal. Para más información sobre elementos de protección personal, puede consultar información en inglés y español proporcionada por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos en el siguiente enlace: www.osha.gov/personal-protective-equipment

Para consultar fichas de seguridad sobre los contenidos de este y otros kits, consulte con su distribuidor local o escríbanos a safety@gentechbio.com

Definición de Símbolos

Para su referencia, a continuación, encontrará la definición de los símbolos contenidos en los diferentes componentes del kit y en el contenido de este manual:



Fabricante del kit



Número de Lote



Fecha de Vencimiento/Expiración



Temperatura de Preservación



CannaSEX qPCR

Accesorios y plásticos útiles	Pipetas Nichipet Premium 0,5 – 10 μ L	Nichiryo	00-NLTW-10
	Pipetas Nichipet Premium 20 – 200 μ L	Nichiryo	00-NLTW-200
	Estación de Frío para PCR CoolCaddy	MTC Bio	R4015
	Tubos 1,5 – 1,7 mL codificados por color SureSeal	MTC Bio	C2000-AST
	Descontaminador UV de Pipetas nUVaClean	MTC Bio	P5590
Extracción de Ácidos Nucleicos	HiPurA® Bacterial Genomic DNA Purification Kit	HiMedia ®	MB505
	IndiSpin Pathogen Kit – Extracción mediante columnas de ácidos nucleicos de forma manual	Indical Bioscience	SP54106

Este producto puede ser empleado únicamente de acuerdo con los protocolos provistos y con los componentes incluidos. Gentech Biosciences no da licencia sobre el uso de su propiedad intelectual para usar o incorporar este producto o sus componentes con componentes no incluidos en el kit a excepción de lo descrito en los protocolos provistos, en este manual y en los protocolos oficiales disponibles. Los protocolos de otros usuarios no han sido validados por Gentech Biosciences y éste no asume garantía sobre el uso del producto con estos protocolos. Adicionalmente, Gentech Biosciences no asegura que estos protocolos no infrinjan condiciones de propiedad intelectual de otros fabricantes o terceros.

Este kit y sus componentes son entregados para uso en una única ocasión y no pueden ser reutilizados, reempacados, o revendidos. Gentech Biosciences no toma partida de ninguna licencia no mencionada. El comprador y usuario de este kit acuerda no favorecer ni tomar acciones que favorezcan el uso no permitido del producto.

Las sondas empleadas en este kit son fabricadas por MacroGen Inc. Los nombres y marcas registrados usados en este documento, incluso cuando no se haga explícito, no deben considerarse desprotegidas por la ley. Todas las marcas y sellos comerciales mencionados son propiedad de sus respectivos autores.