

**PROBE qPCR Master Mix**  
**Código: 13-10506-01 – 100 reações**

**Instruções de Uso**

**1. Descrição**

A *PROBE qPCR Master Mix* é um kit desenvolvido para ensaios de PCR quantitativos (qPCR) utilizando sondas fluorogênicas que incorporam as sondas TaqMan e que contêm a enzima *HotStart Taq DNA polymerase*.

A *Hot Start Taq DNA polymerase* é uma Taq polimerase recombinante complexada com um anticorpo monoclonal anti-Taq que bloqueia a atividade da enzima à temperatura ambiente proporcionando um "início a quente" automático nas reações de qPCR com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade deste ensaio de detecção.

Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em tempo real que exigem alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de DNA com sondas fluorogênicas incluindo a detecção e quantificação de agentes patogênicos, organismos geneticamente modificados e análise de expressão gênica.

A sonda qPCR Master Mix é compatível com os instrumentos de PCR em tempo real, incluindo os que não requerem o corante de referência ROX, a saber; Roche LightCycler 480, Qiagen Rotor-Gene Q /3000/6000, Eppendorf Mastercycler ep / realplex realplex 2 s, Illumina Eco qPCR, Bio- Rad CFX96 / CFX384, BioRad iCycler iQ / Meu iQ / IQ5 e Thermo Scientific PikoReal real-Time PCR, Applied Biosystems 7500/7500 Rápido / ViiA 7 / QuantStudio 12K Flex e Stratagene Mx3000P / Mx3005P / MX4000 e Bioer.

**2. Lista de Componentes**

Cada kit contém reagentes suficientes para realizar 100 reações com volume final de 25 µL

| Volume  | 13-10506-01                     | 100 reações |
|---------|---------------------------------|-------------|
| 1.25 mL | <i>2X PROBE qPCR Master Mix</i> | 1 tubo      |
| 1000 µL | <i>Água ultra-pura PCR</i>      | 1 tubo      |

**3. Modo de Uso**

Este protocolo é para um volume final de reação de 25µL. No entanto, o volume da reação poderá ser ajustado conforme desejado.

Para reação múltipla, preparar uma mistura principal dos componentes comuns a todas as reações para diminuir os erros de pipetagem

**1.** Descongelar os componentes à temperatura ambiente. Quando descongeladas, ressuspender o 2X PROBE qPCR Master Mix, *primers* e sonda com auxílio do vórtex e, em seguida, brevemente centrifugar para recolher a solução no fundo do tubo.

A fim de maximizar a especificidade, manter todos os componentes, as misturas de reação e as amostras em gelo.

2. Preparar a seguinte mistura de reação para cada amostra:

| Componentes                                    | Volume    | Conc. Final           |
|--|-----------|-----------------------|
| 2X PROBE qPCR Master Mix or Master Mix LOW ROX | 12.5 µL   | 1X                    |
| Primer Forward (20 µM)                         | 0.5 µL    | 0.4 µM (0.2 – 0.8 µM) |
| Primer Reverse (20 µM)                         | 0.5 µL    | 0.4 µM (0.2 – 0.8 µM) |
| Probe (10 µM)                                  | 0.5 µL    | 0.2 µM                |
| DNA Template                                   | ≤ 10.5 µL |                       |
| Nuclease-free water                            | to 25 µL  |                       |

3. Condições de amplificação sugeridas pra qPCR

Protocolo *step cycling*

| Stage     | Step                  | Temp                         | Time    |
|-----------|-----------------------|------------------------------|---------|
| Hold      | Desnaturação Inicial  | 95°C                         | 2 min   |
| 40 cycles | Desnaturação          | 95°C                         | 15 seg  |
|           | Anelamento e Extensão | 60°C<br>(Aquisição de dados) | 60 seg* |

O tempo de extensão é dependente da aquisição dos dados e deverá ser ajustado para cada instrumento de qPCR. A etapa apropriada para a aquisição de dados fluorescentes varia para diferentes formatos de ensaios com sonda. A aquisição de dados de ensaios com sondas de 5'-nuclease (TaqMan) deve ser realizado no final da etapa de extensão.

Alguns pares de *primers* podem exigir um protocolo de ciclagem de 3 etapas para um desempenho ideal. A temperatura de *melting* e da concentração dos *primers* podem precisar ser definidos empiricamente para pares de *primers* específicos e o instrumento termociclador.

Protocolo *step cycling*

| Etapa     | Passo                | Temperatura                   | Tempo  |
|-----------|----------------------|-------------------------------|--------|
| Hold      | Desnaturação Inicial | 95°C                          | 2 min  |
| 40 ciclos | Desnaturação         | 95°C                          | 15 seg |
|           | Anelamento           | 50°C – 60°C                   | 15 seg |
|           | Extensão             | 72°C<br>(Aquisição dos dados) | 45 seg |

#### 4. Ensaio de Otimização

O desenho dos *primers* e das sondas altamente específicos é um parâmetro crítico para a qPCR bem-sucedida. O uso de programas para desenho dos *primers* é recomendada, a fim de minimizar a formação de estruturas secundárias internas e auto - Anelamento na extremidade 3' dentro de cada *primer*, o par de *primers*, e as combinações *primer*/sonda.

Para melhores resultados, o tamanho do *amplicom* deve ser limitada a 65-200 pb. Os resultados ótimos podem requerer titulação da concentração de iniciador de entre 200 e 800 nM. A concentração final de 400 nM de cada *primer* e sonda de 200 nM é ideal para a maioria das aplicações.

O aumento da concentração do *primer* que inicia a síntese da cadeia alvo que é complementar à sonda pode melhorar o sinal de fluorescência para alguns conjuntos de *primer*/sonda.

#### 5. Ensaio de Controle de Qualidade

Este kit é funcionalmente testado em ensaios de qPCR utilizando o equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* seguindo os procedimentos descritos neste manual (protocolo de ciclagem 2-etapas = 2 *cycling*) para a detecção do gene de RNase P a partir de 20 ng de DNA genômico humano como *template*.

##### *RnaseP Forward Primer*

5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'

##### *RnaseP Reverse Primer*

5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'

##### *RnaseP Probe*

5'FAM TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG BHQ1 3'

O gene de RNase P humana é um gene de cópia única que codifica a fração de RNA para a enzima RNase P.

A análise de ensaio de qPCR em tempo real deve demonstrar a detecção do gene de RNase P humano com um CT (limiar de ciclo) <30.

#### 6. Armazenamento

Armazenar em -20°C.

#### 7. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **PROBE qPCR Master Mix** por ela fornecida contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

## **8. Informações do Fabricante**

### **NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA**

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE  
CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL  
CNPJ: 24.096.423/0001-15

### **RESPONSÁVEL TÉCNICO**

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA- CRBM 20.951/1

## **9. Atendimento ao Consumidor**

Tel. +55 (11) 4243-2356  
[www.novabiotecnologia.com.br](http://www.novabiotecnologia.com.br)  
e-mail: [assessoria@novabiotecnologia.com.br](mailto:assessoria@novabiotecnologia.com.br)