

SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX – 100 Reações**13-10505-01 – 100 reações****Ficha de Instruções de Uso****1. Descrição**

O *SYBR Green qPCR Master Mix* (2X concentrada) contendo a enzima *HotStart Taq DNA* Polimerase e o corante de referência passiva *Low Rox* são indicados para uso em PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em Tempo Real que demandam alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de DNA utilizando o corante fluorescente *SYBR Green* incluindo a detecção e quantificação de agentes infecciosos, genes de organismos geneticamente modificados e análise da expressão gênica.

A tecnologia *Hot Start* é realizada através de um anticorpo que bloqueia a atividade da enzima *Taq DNA* Polimerase a temperatura ambiente e apresenta vantagens para detecção e quantificação de DNA em reações de qPCR em tempo real devido à eliminação da amplificação de produtos de PCR inespecíficos e formação de dímeros de primers (*primers dimers*).

O *SYBR Green qPCR Master Mix* é um reagente de nova geração que pode reduzir o tempo da qPCR para 30-40 minutos. Observação: Os tempos de reação podem variar a depender das sequências dos produtos de PCR ou de acordo com a otimização dos *primers*.

2. Componentes do Kit

Contém reagentes para a realização de reações de PCR em Tempo real com volume final de 20µL incluindo:

Cód. No.	13-10505-01	100 reações
1 x 1,00 mL	<i>SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX</i>	microtubo âmbar de 1,5 mL

3. Modo de Uso

Programar o equipamento de PCR em tempo real para a realização da Reação de *SYBR Green qPCR* com os seguintes parâmetros de temperatura e tempo de reação:

Protocolo de qPCR em 2 etapas

	Temp	Tempo	Ciclos
Ativação <i>Taq DNA</i> Polimerase	95°C	2 minutos	-
Desnaturação	95°C	15 segundos	30 ciclos
Pareamento e Extensão	60°C	1 minuto	
Curva de Dissociação	-	-	-

Programar a leitura da fluorescência do corante *SYBR Green* na etapa de Pareamento e Extensão (60°C por até 1 minuto) da reação de qPCR.

A Curva de Dissociação também é chamada de Curva de “Melting” ou “Melting Curve” e deverá ser realizada de acordo com o manual de instruções do equipamento de PCR em tempo real.

Protocolo de qPCR em 3 etapas

Para alguns alvos de DNA, a realização da reação de qPCR em 3 etapas pode apresentar melhores resultados:

	Temp	Tempo	Ciclos
Ativação Taq	95°C	2 minutos	-
Desnaturação	95°C	15 segundos	30 ciclos
Pareamento	55°C	15 segundos	
Extensão	68°C ou 72°C	45 segundos	
Curva de Dissociação	-	-	-

A temperatura ótima da reação de qPCR (pareamento dos *primers*) pode variar entre 50°C a 60°C.

Programar a leitura da fluorescência do corante *SYBR Green* na etapa de Extensão (68°C ou 72°C por até 1 minuto) da reação de qPCR.

A Curva de Dissociação também é chamada de Curva de “Melting” ou “Melting Curve” e deverá ser realizada de acordo com o manual de instruções do equipamento de PCR em tempo real.

Preparar a mistura da reação de qPCR:

Componentes	Volume	Concentração Final
<i>SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX (2X conc.)</i>	10,0 µL	1X
<i>Primer Forward (10 µM)</i>	0,5 µL	0,2 µM *
<i>Primer Reverse (10 µM)</i>	0,5 µL	0,2 µM *
<i>DNA Template</i>	≤ 11,5 µL	-
<i>Nuclease-free water</i>		
Volume Total	20 µL	

***A concentração ótima dos primers em reações PCR em Tempo Real pode variar entre 0,1 µM e 0,5 µM.**

Para múltiplas reações, preparar uma mistura principal contendo 2X *SYBR Green qPCR Master Mix*, *Primer Forward*, *Primer Reverse* e H₂O para Biologia Molecular, adicionar o volume correspondente nos microtubos ou poços da microplaca de amplificação e a seguir, adicionar o DNA purificado por um *kit* ou reagente de biologia molecular. Fechar os microtubos ou microplaca de amplificação. Colocar os microtubos ou microplaca no termociclador e iniciar a reação de qPCR.

Notas sobre a otimização da Reação de *SYBR Green qPCR*:

- Concentração dos *Primers*

Altas concentrações de *primers* na reação de *SYBR Green qPCR* favorecem a formação de produtos de PCR inespecíficos e dímeros de *primers* (“*primers dimers*”).

Por outro lado, baixas concentrações de *primers* diminuem a sensibilidade da reação de qPCR.

Assim sendo, caso necessário, otimizar a reação de *SYBR Green qPCR* utilizando as seguintes concentrações de *primers*: 0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM, 0,4 µM e 0,5 µM.

4. Controle de Qualidade

Cada lote do *kit SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX* é avaliado em reações de PCR em Tempo Real seguindo o protocolo descrito neste manual (Protocolo de qPCR em 2 etapas) para a

amplificação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humano (GAPDH) a partir de 10ng de DNA genômico humano.

A análise do ensaio de qPCR em tempo real deverá demonstrar a detecção do gene GAPDH com Ct (cycle threshold) < 30 e a ausência de produtos de PCR inespecíficos e dímeros de *primers* na Curva de “Melting” da reação de qPCR.

Produto para uso em pesquisas científicas. RUO.

5. Armazenamento

Armazenamento e transporte a -20°C. Validade: 24 meses se mantido nas condições de armazenamento ideais.

6. Informação de Segurança

- Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.
- Depois de receber o produto verificar se as embalagens estão danificadas ou se há vazamento.
- Produto de uso apenas laboratorial e deverá ser armazenado em condições próprias para uso em laboratório.

Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

7. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX** 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 20951

9. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: sac@novabiotecnologia.com.br assessoria@novabiotecnologia.com.br