

Sybr Green One-Step qPCR master mix 2X
13-10507-01S - 100 reações
Ficha de Instruções de Uso**1. Descrição**

O kit Sybr One-Step RT-qPCR foi desenvolvido para ensaios quantitativos de RT-PCR (RT-qPCR) em um único tubo contendo Sybr green, M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus e Hot Start Taq DNA Polymerase. Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em tempo real que requerem alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de RNA.

O MMLV Reverse Transcriptase RNase H Minus é uma versão do MMLV RT que foi projetada para reduzir a atividade da RNase H e fornecer maior estabilidade térmica para sintetizar moléculas de cDNA até 60°C. A Hot Start Taq DNA Polymerase é uma Taq DNA polimerase recombinante complexada com um anticorpo monoclonal anti-Taq que bloqueia a atividade da polimerase em temperatura ambiente, fornecendo um “hot start” automático em qPCR para maior sensibilidade e detecção de especificidade. O Sybr Green one step qPCR 2X Reaction Mix é um tampão proprietário contendo 6 mM MgSO₄, 0,4 mM de cada dNTP e estabilizadores.

2. Armazenamento e Transporte

Armazenar e transportar em -20°C

3. Conteúdo

Contém reagentes suficientes para a realização de 100 reações com volume final de 25 µL incluindo:

Cat. No.		100 reactions
50 µL	M-MLV RT / Hot Start Taq Mix	RED CAP
1.25 mL	2X Reaction Mix	BLUE CAP

4. Modo de Uso

Este protocolo é para um volume de reação de 25µL. O volume da reação pode ser ajustado conforme desejado.

Para reações múltiplas, preparar uma mistura mãe dos componentes comuns a todas as reações para reduzir os erros de pipetagem.

1. Descongelar os componentes em temperatura ambiente. Quando descongelado, ressuspenda o 2X Reaction Mix, 50 mM MgSO₄, ROX Reference Dye (opcional) e primers por vórtex e, em seguida, centrifugue brevemente para coletar a solução no fundo do tubo.

Para maximizar a especificidade, manter todos os componentes, misturas de reação e amostras no gelo. A Taq DNA Polymerase Hot Start fica inativa antes da ativação em alta temperatura; no entanto, a transcriptase reversa é ativa em temperaturas mais baixas.

2. Preparar a reação para cada amostra como indicado a seguir:

Componente	Volume	Concentração Final
2X Reaction Mix	12.5 µL	1X
Forward Primer (40 µM)	0.5 µL	0.8 µM (0.2–1 µM)
Reverse Primer (40 µM)	0.5 µL	0.8 µM (0.2–1 µM)
M-MLV RT / Hot Start Taq Mix	0.5 µL	

RNA Template	≤10 µL	1 pg to 1 µg total RNA
Nuclease-free water	to 25 µL	

3. Parâmetros de amplificação recomendados para-RT-qPCR: Protocolo de ciclagem em duas etapas

Stage	Step	Temp	Time
Hold	Reverse Transcription	50°C– 60°C	15– 30 min
Hold	Initial denaturation	95°C	2 min
40 cycles	Denature	95°C	15 sec
	Anneal and Extend	60°C (data collection)	30 – 60 sec

4. A temperatura ideal para a etapa de transcrição reversa pode variar de 50°C a 60°C, dependendo da sequência alvo e das condições de reação.

5. Para a maioria das amostras de RNA, a síntese eficiente de cDNA pode ser realizada em uma incubação de 15 minutos a 50°C. Para modelos “problemáticos” contendo estrutura secundária extensa, ou para aumentar a especificidade do *priming* de cDNA, aumentar a temperatura de síntese de cDNA até 60°C.

6. Um protocolo de ciclagem de 3 etapas (anelamento e etapas de extensão) pode melhorar a sensibilidade e especificidade do ensaio com alguns conjuntos de iniciadores.

7. step cycling protocol

Stage	Step	Temp	Time
Hold	Reverse Transcription	50°C– 60°C	15– 30 min
Hold	Initial Denaturation	95°C	2 min
40 cycles	Denature	95°C	15 sec
	Anneal	50°C–55°C	15 sec
	Extend	72°C (data collection)	45– 60 sec

O kit Sybr One-Step RT-qPCR funciona sob uma ampla gama de parâmetros de ciclagem. O protocolo geral pode ser modificado para alcançar os resultados mais sensíveis e específicos.

5. Controle de Qualidade

Cada lote do kit é avaliado em reações de RT-qPCR em tempo real em um termociclador ABI 7500 Real-Time PCR System seguindo de protocolos descritos pelo **CDC**.

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 a embalagem está danificada ou se há vazamento. Se houver danos ou com vazamento, usar luvas e óculos de proteção quando descartar os frascos para evitar acidentes.
- Não usar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- Sempre trocar as ponteiros entre as transferências de líquidos para evitar a contaminação cruzada.
- Não misturar componentes de kits diferentes, se não forem do mesmo produto e do mesmo lote.
- Este produto deve ser usado apenas por pessoal treinado.
- Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- Contaminações causadas pelos resíduos são raríssimas, mas não podem ser completamente descartadas. Portanto, os resíduos devem ser considerados como material infeccioso e devem ser manuseados de acordo com as normas de segurança regulamentadas.

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

7. Precauções e cuidados especiais

- Utilizar somente seguindo as instruções acima indicadas;
- Abrir a embalagem o mais próximo possível no momento do uso;
- Evitar o contato direto com a pele, olhos e/ou roupas;
- Recomenda-se a utilização de luvas para aplicação do produto;
- Conservar a embalagem em local fresco e seco;
- Não reutilizar a embalagem vazia;
- Não misturar com outros produtos;
- Manter o produto em sua embalagem original.

8. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** oferece garantia do produto por ela fornecido 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.

9. 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

10. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

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