

**One-Step RT-PCR System C/Hot Start Taq DNA Polymerase**  
**13-10503-01 – 100 reações**  
**Ficha de Instruções de uso**

**1. Uso pretendido**

Sistema para uso em reação de transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia em um único tubo (*One-Step RT-PCR*) contendo as enzimas Transcriptase Reversa *M-MLV* RNase Minus e *Hot Start Taq* DNA Polimerase.

O formato da reação de *RT-PCR* em um único tubo pode ser empregado em rotinas de biologia molecular com um grande número de amostras diminuindo o risco de contaminações.

Este sistema combina a termoestabilidade da enzima Transcriptase Reversa *M-MLV* RNase Minus com a especificidade da enzima *Hot-Start Taq* DNA Polimerase para aumentar a especificidade dos iniciadores da reação de PCR, gerando rendimento superior dos produtos de amplificação e alta sensibilidade na detecção dos genes alvos.

Devido a mutações de ponto, a enzima Transcriptase Reversa *M-MLV* RNase Minus possui atividade de RNase H reduzida sendo capaz de sintetizar moléculas de cDNA entre as temperaturas de 45°C a 60°C. Desta forma, para genes complexos com alto conteúdo de bases GC, a reação de transcrição reversa pode ser realizada na temperatura de 60°C.

A *Hot-Start Taq* DNA Polimerase possui um anticorpo monoclonal que bloqueia a atividade de polimerase na temperatura ambiente. Esta atividade é restaurada após a incubação por 2 minutos a 95°C, possibilitando a tecnologia "*Hot-start PCR*" que garante uma maior sensibilidade, especificidade e rendimento dos produtos de PCR.

A solução 2X Tampão de Reação RT-PCR foi desenvolvida para permitir uma eficiente reação de transcrição reversa e reação específica de PCR, contendo 0.4 mM de cada dNTP, 3.2 mM MgSO<sub>4</sub> e estabilizadores da reação de *RT-PCR*.

Este *kit* foi otimizado para detecção "*end-point*" dos produtos amplificados em reações de RT-PCR, permitindo uma fácil análise da expressão de genes alvos ou detecção de RNA viral de agentes infecciosos.

**2. Características do produto**

Contém reagentes para a realização de **100 reações** com volume final de **50 µL** incluindo:

Componentes	Volumes	Características
Enzimas One-Step RT-PCR	100 µL	Tampa Vermelha
2X Tampão de Reação RT-PCR Tampão contendo 0,4mM de cada dNTPs e 3,2mM MgSO <sub>4</sub>	2 x 1,25 mL	Tampa Transparente
25mM MgSO <sub>4</sub>	1 mL	Tampa Transparente

**3. Armazenamento**

Armazenar em -20°C, em embalagem fechada. Transportar em temperatura de -20°C.

**4. Validade**

12 meses a partir da data de fabricação.

**5. Informação de Segurança**

5.1 Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.

- 5.2 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.
- 5.3 Não usar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- 5.4 Sempre trocar as ponteiros entre as transferências de líquidos para evitar a contaminação cruzada.
- 5.5 Não misturar componentes de kits diferentes, se não forem do mesmo produto e do mesmo lote.
- 5.6 Este produto deve ser usado apenas por pessoal treinado.
- 5.7 Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- 5.8 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.
- 5.9 Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a **NOVA BIOTECNOLOGIA**.

## 6. Procedimento

### Reações de RT-PCR

**6.1.** Programar o equipamento de PCR para a realização das reações de transcrição reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia (PCR) em um único tubo com os seguintes parâmetros de temperatura e tempo de reação:

Transcrição Reversa	Ativação Taq	Reação de PCR (40 ciclos)		
		Desnaturação	Pareamento	extensão
45°C a 60°C	95°C	95°C	55° a 65°C	68°C
15 a 30 minutos	2 minutos	15 segundos	30 segundos	1 minuto/kb

Obs.: Opcionalmente, incluir uma etapa final de extensão constituída por um ciclo na temperatura de 68°C por 5 minutos.

A temperatura ótima da reação de transcrição reversa pode variar entre 45°C a 60°C dependendo da sequência alvo e condições da reação. Da mesma forma, a temperatura ótima da etapa de pareamento dos primers (“annealing”) da reação de PCR pode variar entre 55°C a 65°C.

### 6.2. Preparar a mistura de amplificação da Reação de RT-PCR.

Adicionar os seguintes reagentes para uma reação de volume final **50µL**:

<b>2X Tampão de Reação RT-PCR</b>	25µL	
<i>Primer Forward</i> (10µM)	2µL	Concentração Final 400nM
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	2µL	Concentração Final 400nM
<b>Enzimas One-Step RT-PCR</b>	1µL	
RNA ALVO	5µL a 20µL	
Água para Biologia Molecular	<b>Completar para 50µL</b>	

Para múltiplas reações, preparar uma mistura principal contendo **2X Tampão de Reação RT-PCR**, *Primer Forward*, *Primer Reverse*, **Enzimas One-Step RT-PCR** e Água para Biologia Molecular, adicionar o volume correspondente nos microtubos ou poços da microplaca de amplificação e a seguir, adicionar o RNA alvo purificado por um kit ou reagente de biologia molecular.

**6.3. Fechar os microtubos ou microplaca de amplificação.**

**6.4. Colocar os microtubos ou microplaca no termociclador e iniciar a reação de RT-PCR.**

**Notas sobre a otimização da Reação de RT-PCR:**

- *Concentração de MgSO<sub>4</sub>*

A solução 2X Tampão de Reação RT-PCR contém sulfato de magnésio para concentração final de 1,6mM. Esta concentração geralmente é suficiente para a maioria dos alvos de RNA. Caso o usuário tenha o interesse de otimizar a reação de RT-PCR, adicionar a solução de 25mM MgSO<sub>4</sub> conforme os volumes apresentados abaixo:

Reações de RT-PCR com volume final de 50µL:

<b>Concentração Final de MgSO<sub>4</sub></b>	<i>2,0mM</i>	<i>4mM</i>	<i>8mM</i>
<b>Volume adicional de 25mM MgSO<sub>4</sub></b>	<i>4µL</i>	<i>8µL</i>	<i>16µL</i>

## **7. GARANTIA DA QUALIDADE**

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece 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.

## **8. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE**

**NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA**

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06715-864 - 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](http://www.novabiotecnologia.com.br)

e-mail: [assessoria@novabiotecnologia.com.br](mailto:assessoria@novabiotecnologia.com.br) [sac@novabiotecnologia.com.br](mailto:sac@novabiotecnologia.com.br)