

**Probe One-Step RT-qPCR kit
13-10507-01 - 100 reações
Ficha de Instruções de Uso****1. Uso pretendido**

Kit para uso em RT-PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR) em único tubo contendo Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus e HotStart Taq DNA Polimerase.

Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em Tempo Real que demandam alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de RNA a partir de sondas fluorescentes incluindo a detecção e quantificação de agentes infecciosos virais e análise da expressão gênica.

Compatível com termociclador que exigem o corante de referência ROX (Low ROX) incluindo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ViiA 7, *QuantStudio* 12K Flex, Agilent Mx3000P, Mx3005P e Mx4000. Compatível com termociclador que não requerem o uso de ROX incluindo Roche LightCycler 480, Qiagen/Corbett Rotor-Gene, Eppendorf Mastercycler ep realplex, Bio-Rad CFX96, BioRad iCycler iQ, BioRad MyiQ, BioRad iQ e Illumina Eco qPCR.

2. Características do produto

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

1,25 mL	2X Tampão de Reação RT-qPCR (6 mM MgSO₄)	Tampa Transparente
500 µL	50mM MgSO₄	Tampa Transparente
1 x 50 µL	Corante de Referência ROX (1,5 µM)	Tampa Marrom
1 x 50 µL	Enzimas One-Step RT-qPCR	Tampa Vermelha

3. Armazenamento

Armazenar e transportar em -20°C

4. Validade

12 meses a partir da data de fabricação

5. 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**.

6. Procedimento

O Probe One-Step RT-qPCR possui todos os reagentes necessários para detecção com alta sensibilidade e especificidade de alvos de RNA através da reação de RT-PCR em Tempo Real quantitativo (RT-qPCR). Este kit permite a realização da reação de transcrição reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia (PCR) em um único tubo. O formato da reação de RT-qPCR em um único tubo pode ser empregado em rotinas de biologia molecular com um grande número de amostras diminuindo o risco de contaminações.

O tubo Enzimas One-Step RT-qPCR contém uma mistura especialmente formulada de enzimas para reação de transcrição reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia (PCR):

- Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus, purificada de *E. coli* através da clonagem do gene pol de MMLV, é utilizada para a síntese de moléculas de cDNA. Esta enzima é ativa a 50°C possuindo uma meia vida de 220 minutos. Devido a mutações de ponto, esta enzima possui atividade de RNase H reduzida e também apresenta uma termoestabilidade aumentada permitindo a realização de reações de transcrição reversa em altas temperaturas (50°C a 60°C).
- HotStart Taq DNA Polimerase recombinante complexada com um anticorpo que bloqueia a atividade de polimerase a temperatura ambiente, para assegurar a termoestabilidade e especificidade da reação. Durante a reação de transcrição reversa, a atividade de polimerase está completamente inativa e não interfere com a reação de transcrição reversa. Após a etapa de transcrição reversa, a reação é aquecida a 95°C por 2 minutos para ativar a atividade de polimerização e simultaneamente inativar a transcriptase reversa.

A solução 2X Tampão de Reação RT-qPCR foi desenvolvida para permitir uma eficiente reação de transcrição reversa e específica reação de PCR contendo 0,4 mM de cada dNTP, 6 mM de MgSO₄ e estabilizadores da reação de RT-qPCR.

Está incluso neste kit um microtubo contendo solução de sulfato de magnésio (MgSO₄) na concentração de 50 mM para otimizações adicionais da reação de RT-qPCR e um microtubo contendo Corante de Referência ROX na concentração de 1,5 µM.

Protocolo para reações de RT-PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR)

Programar o equipamento de PCR em Tempo Real 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:

Protocolo de qPCR em 2 etapas

Transcrição Reversa	Ativação Taq	qPCR em 2 etapas (45 ciclos)	
		Desnaturação	Pareamento e Extensão
55°C	95°C	95°C	60°C
30 minutos	2 minutos	15 segundos	1 minuto

Realizar a leitura da fluorescência durante a 2ª etapa do ciclo de amplificação (60°C por 1 minuto).

A temperatura ótima da reação de transcrição reversa pode variar entre 50°C a 60°C dependendo da sequência alvo e condições da reação. Da mesma forma, a temperatura ótima da reação de qPCR pode variar entre 50°C a 60°C.

Protocolo de qPCR em 3 etapas

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

Transc. Reversa	Ativação Taq	qPCR em 3 etapas (45 ciclos)		
		Desnaturação	Pareamento	Extensão
60°C	95°C	95°C	55°C	72°C
30 minutos	2 minutos	15 segundos	15 segundos	1 minuto

Realizar a leitura da fluorescência durante a 3ª etapa do ciclo de amplificação (72°C por 45 segundos).

A temperatura ótima da reação de transcrição reversa pode variar entre 50°C a 60°C dependendo da sequência alvo e condições da reação. Da mesma forma, a temperatura ótima da reação de qPCR pode variar entre 50°C a 60°C.

Preparar a mistura de amplificação da Reação de RT-qPCR.

Adicionar os seguintes reagentes para uma reação de volume final 25µL:

2X Tampão de Reação RT-qPCR	12,5 µL	
Primer Direto (40 µM)	0,5 µL	Conc. Final 800 nM
Primer Reverso (40 µM)	0,5 µL	Conc. Final 800 nM
Sonda Fluorescente (10 µM)	0,5 µL	
Corante de Referência ROX*	0,5 µL	
Enzimas One-Step RT-qPCR	0,5 µL	

RNA PURIFICADO

5 µL a 10 µL

Água para Biologia Molecular

Completar para 25 µL

* O corante de referência ROX poderá ser excluído da mistura de amplificação para uso em equipamentos de PCR em Tempo Real de não requerem o uso de um corante passivo para normalização dos dados.

Para múltiplas reações, preparar uma mistura principal contendo **2X Tampão de Reação RT-qPCR**, Primer Direto, Primer Reverso, Sonda Fluorescente, Corante de Referência ROX e **Enzimas One-Step RT-qPCR** e Água para Biologia Molecular, adicionar o volume correspondente nos microtubos ou poços da microplaca de amplificação e a seguir, adicionar o RNA 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 RT-qPCR.

- *Concentração de MgSO₄*

A solução 2X Tampão de Reação RT-qPCR (6 mM MgSO₄) contém sulfato de magnésio para a concentração final de 3 mM. Esta concentração geralmente funciona para a maioria dos alvos de RNA. Caso o usuário tenha o interesse de otimizar a reação de RT-qPCR entre 3 mM e 6 mM de MgSO₄, adicionar a solução de 50 mM MgSO₄ conforme os volumes apresentados abaixo:

Reações de RT-qPCR com volume final de 25 µL:

Concentração Final de MgSO₄	4,0 mM	5,0 mM	6,0 mM
Volume adicional de 50mM MgSO₄	0,5 µL	1 µL	1,5 µL

- **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 o protocolo descrito em **CDC *protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1) 28 April 2009 revision 1 (30 April 2009)*** para o gene RnaseP.

A análise do ensaio de RT-qPCR em tempo real deverá demonstrar a detecção do RNA sintético correspondente ao gene da RNase P com Ct (cycle threshold) < 30 e a ausência de degradação da sonda fluorescente RNP nos controles negativos contendo água para Biologia Molecular.

7. 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.

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: assessoria@novabiotecnologia.com.br sac@novabiotecnologia.com.br