

## SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX – 100 Reações

**Código:** 13-10505-01

Armazenamento: -20°C.

Estável por 10 dias em temperatura ambiente

**Descrição:** O kit Sybr green qPCR Master Mix Low ROX é recomendado para ensaios quantitativos de PCR (qPCR). Esta mix é composta do fluoróforo SybrGreen e a enzima recombinante HotStart Taq DNA Polymerase.

Taq-Hot Start - DNA polimerase, trata-se da versão quimicamente modificada da enzima Taq DNA Polimerase Hot-Start, que evita amplificações inespecíficas durante as etapas da amplificação. Esta enzima requer uma etapa prévia de ativação de 95°C durante 03 minutos.

Esta mix é compatível com a maioria dos equipamentos para qPCR, inclusive os que não requerem o fluoróforo de referência ROX. A saber;

Roche LightCycler 480, Qiagen Rotor-Gene Q / 3000 / 6000, Eppendorf Mastercycler ep realplex / realplex2 s, Illumina Eco qPCR, Bio-Rad CFX96 / CFX384, BioRad iCycler iQ / MyiQ / iQ5 and Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR, Bioer, Applied Biosystems 7500 / 7500 Fast / ViiA 7 / QuantStudio 12K Flex and Stratagene Mx3000P / Mx3005P / Mx4000.

**Componentes:** Cada produto contém reagentes suficientes para reações de volume final 25 µL por reação.

Cód. N°.	13-10505-01	100 reactions
1,25 mL	2X Sybr Green qPCR Master Mix LOW ROX	D.A.
50 µL	Hot Start Taq DNA Polymerase	D.A.

**Protocolo:** Este protocolo indica as concentrações sugeridas para um volume final de 25 µL. Contudo, estes volumes podem ser modificados, de acordo com os ensaios de cada pesquisador.

1. Descongelar os componentes, em temperatura ambiente. Quando descongelados, preparar a mix de reação contendo; 2X Sybr Green Master Mix Low rox e os primers para amplificação da região alvo. Misturar no vórtex e após centrifugar rapidamente para coletar todo o volume da reação no fundo do tubo. Para manter os componentes viáveis permanecer com os tubos no gelo.

2. Preparar a mix de reação como a seguir:

Componente	Volume	Conc. Final
2X SybrGreen qPCR Master Mix or Master Mix LOW ROX	12.5 µL	1X
Primer Forward (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM (0.1

		- 0.5 µM)
Primer Reverse (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM (0.1 - 0.5 µM)
Hot Start Taq DNA Polymerase	0.5 µL	
DNA Template	≤ 11 µL	
Nuclease-free water		q.s.p. 25 µL

### Parâmetros de amplificação recomendados:

#### 2-Protocolo *step cycling*

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Hold	Desnaturaçã o inicial	95°C	2 min
40 cycles	Desnaturaçã o	95°C	15 sec
	Anelamento e extensão	60°C (data collection)	60 sec*
Curva de Melting (dissociação)		Proceder de acordo com cada equipamento	

\* O tempo de extensão é dependente do tamanho do amplicon. Alguns *primers* podem precisar de uma etapa adicional de ciclagem para um melhor desempenho.

#### 3- Protocolo *step cycling*

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Hold	desnaturaçã o Inicial	95°C	2 min
40 cycles	Desnaturaçã o	95°C	15 sec
	Anelamento	50°C – 60°C	15 sec
	Extensão	68°C – 72°C (data collection)	45 sec
Curva de Melting (dissociação)		Proceder de acordo com cada equipamento	

### Ensaio de Controle da Qualidade

Este kit é testado funcionalmente em ensaios de qPCR utilizando equipamentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e Line Gene 9600 Bioer, seguindo os procedimentos descritos nesta ficha (protocolo de ciclagem 2-passos) para a detecção do gene de RNase P a partir de 20 ng de DNA genômico humano como template. O gene de RNase P humana é um gene de cópia única que codifica a fracção 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.