

PROBE qPCR Master Mix

Código: 13-10506-01 – 100 reações

Armazenamento: –20°C.

Este kit é estável durante 10 dias à temperatura ambiente.

Descrição: *PROBE qPCR Master Mix* é um novo kit desenvolvido para ensaios de PCR quantitativos (qPCR) utilizando sondas fluorogênicas que incorporam as sondas TaqMan e que contêm a enzima *HotStart Taq DNA polymerase*.

A *Hot Start Taq DNA polymerase* é uma Taq polimerase recombinante complexada com um anticorpo monoclonal anti-Taq que bloqueia a atividade da enzima à temperatura ambiente proporcionando um "início a quente" automático nas reações de qPCR com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade deste ensaio de detecção.

Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em tempo real que exigem alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de DNA com sondas fluorogênicas incluindo a detecção e quantificação de agentes patogênicos, organismos geneticamente modificados e análise de expressão gênica.

A sonda qPCR Master Mix é compatível com os instrumentos de PCR em tempo real, incluindo os que não requerem o corante de referência ROX, a saber; Roche LightCycler 480, Qiagen Rotor-Gene Q /3000/6000, Eppendorf Mastercycler ep / realplex realplex 2 s, Illumina Eco qPCR, Bio- Rad CFX96 / CFX384, BioRad iCycler iQ / Meu iQ / IQ5 e Thermo Scientific PikoReal real-Time PCR, Applied Biosystems 7500/7500 Rápido / VIIa 7 / QuantStudio 12K Flex e Stratagene Mx3000P / Mx3005P / MX4000 e Bioer.

Lista de componentes: Cada kit contém reagentes suficientes para realizar 100 reações com volume final de 25 µL

Cód. N°	13-10506-01	100 reações
1.25 mL	<i>2X PROBE qPCR Master Mix</i>	1 tubo
50 µL	<i>Hot Start Taq DNA Polymerase</i>	1 tubo

- **Obs.: Amostra q.s.p 10 reações**

Protocolo: Este protocolo é para um volume final de reação de 25 µL. No entanto, o volume da reação poderá ser ajustado conforme desejado.

Para reação múltipla, preparar uma mistura principal dos componentes comuns a todas as reações para diminuir os erros de pipetagem.

1. Descongelar os componentes à temperatura ambiente. Quando descongeladas, ressuspender o *2X PROBE qPCR Master Mix*, *primers* e sonda com auxílio do vórtex e, em seguida, brevemente centrifugar para recolher a solução no fundo do tubo.

A fim de maximizar a especificidade, manter todos os componentes, as misturas de reação e as amostras em gelo.

2. Preparar a seguinte mistura de reação para cada amostra:

Componente	Volume	Conc. Final
<i>2X PROBE qPCR Master Mix or Master Mix LOW ROX</i>	12.5 µL	1X
<i>Primer Forward</i> (20 µM)	0.5 µL	0.4 µM (0.2 – 0.8 µM)
<i>Primer Reverse</i> (20 µM)	0.5 µL	0.4 µM (0.2 – 0.8 µM)
<i>Probe</i> (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
<i>Hot Start Taq DNA Polymerase</i>	0.5 µL	
<i>DNA Template</i>	≤ 10.5 µL	
<i>Nuclease-free water</i>	to 25 µL	

Condições de amplificação sugeridas pra qPCR

2- Protocolo *step cycling*

Stage	Step	Temp	Time
Hold	Desnaturação inicial	95°C	2 min
40 cycles	Desnaturação	95°C	15 seg
	Anelamento e Extensão	60°C (aquisição de dados)	60 seg*

* O tempo de extensão é dependente da aquisição dos dados e deverá ser ajustado para cada instrumento de qPCR. A etapa apropriada para a aquisição de dados fluorescentes varia para diferentes formatos de ensaios com sonda. A aquisição de dados de ensaios com sondas de 5'-

nuclease (TaqMan) deve ser realizado no final da etapa de extensão.

Alguns pares de *primers* podem exigir um protocolo de ciclagem de 3 etapas para um desempenho ideal. A temperatura de *melting* e da concentração dos *primers* podem precisar ser definidos empiricamente para pares de *primers* específicos e o instrumento termociclador.

3- Protocolo *step cycling*

Etapa	Passo	Temperatura	Tempo
<i>Hold</i>	denaturação inicial	95°C	2 min
40 ciclos	Denaturação	95°C	15 seg
	Anelamento	50°C – 60°C	15 seg
	Extensão	72°C (aquisição dos dados)	45 seg

Ensaio de otimização: O desenho dos *primers* e das sondas altamente específicos é um parâmetro crítico para a qPCR bem sucedida. O uso de programas para desenho dos *primers* é recomendada, a fim de minimizar a formação de estruturas secundárias internas e auto-anelamento na extremidade 3' dentro de cada *primer*, o par de *primers*, e as combinações *primer*/sonda.

Para melhores resultados, o tamanho do amplicom deve ser limitada a 65-200 pb. Os resultados ótimos podem requerer titulação da concentração de iniciador de entre 200 e 800 nM. A concentração final de 400 nM de cada *primer* e sonda de 200 nM é ideal para a maioria das aplicações.

O aumento da concentração do *primer* que inicia a síntese da cadeia alvo que é complementar à sonda pode melhorar o sinal de fluorescência para alguns conjuntos de *primer*/sonda.

Ensaio de controle da qualidade: Este kit é funcionalmente testado em ensaios de qPCR utilizando o equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* seguindo os procedimentos descritos neste manual (protocolo de ciclagem 2-etapas = 2 *cycling*) para a detecção do gene de RNase P a partir de 20 ng de DNA genômico humano como *template*.

RnaseP Forward Primer

5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'

RnaseP Reverse Primer

5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'

RnaseP Probe

5'FAM TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG BHQ1 3'

O gene de RNase P humana é um gene de cópia única que codifica a fração 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.