

SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX – 100 Reações

Código: 13-10505-01

Instruções de Uso

1. Descrição

O SYBR Green para uso em PCR em tempo real quantitativo (qPCR) contendo a enzima HotStart Taq DNA Polimerase e o corante fluorescente SYBR Green.

Este kit foi otimizado para aplicações de PCR em Tempo Real que demandam alta sensibilidade e especificidade na detecção de alvos de DNA utilizando o corante fluorescente SYBR Green incluindo a detecção e quantificação de agentes infecciosos, genes de organismos geneticamente modificados e análise da expressão gênica.

A tecnologia HotStart é realizada através de um anticorpo que bloqueia a atividade da enzima Taq DNA Polimerase a temperatura ambiente e apresenta vantagens para detecção e quantificação de DNA em reações de qPCR em tempo real devido a eliminação da amplificação de produtos de PCR inespecíficos e formação de dímeros de primers (“*primers dimers*”).

2. Componentes do Kit

Contém reagentes para a realização de reações de PCR em Tempo real com volume final de 25µL incluindo:

Cat. No.	13-10505-01	100 reações
1 x 1,25 mL	2X SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX	TAMPA AMARELA

3. Modo de Uso

Programar o equipamento de PCR em tempo real para a realização da Reação de SYBR Green qPCR com os seguintes parâmetros de temperatura e tempo de reação:

Protocolo de qPCR em 2 etapas

	Temp	Tempo	Ciclos
Ativação Taq	95°C	2 minutos	-
Desnaturação	95°C	15 segundos	30 ciclos
Pareamento e Extensão	60°C	1 minuto	
Curva de Dissociação	-	-	-

Programar a leitura da fluorescência do corante SYBR Green na etapa de Pareamento e Extensão (60°C por 1 minuto) da reação de qPCR.

A Curva de Dissociação também é chamada de Curva de “Melting” ou “Melting Curve” e deverá ser realizada de acordo com o manual de instruções do equipamento de PCR em tempo real.

Protocolo de qPCR em 3 etapas

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

	Temp	Tempo	Ciclos
Ativação Taq	95°C	2 minutos	-
Desnaturação	95°C	15 segundos	30 ciclos
Pareamento	55°C	15 segundos	
Extensão	68°C ou 72°C	45 segundos	
Curva de Dissociação	-	-	-

A temperatura ótima da reação de qPCR (pareamento dos primers) pode variar entre 50°C a 60°C.

Programar a leitura da fluorescência do corante SYBR Green na etapa de Extensão (68°C ou 72°C por 1 minuto) da reação de qPCR.

A Curva de Dissociação também é chamada de Curva de “Melting” ou “Melting Curve” e deverá ser realizada de acordo com o manual de instruções do equipamento de PCR em tempo real.

Preparar a mistura da reação de qPCR:

Componentes	Volume	Concentração Final
2X SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX	12,5 µL	1X
Primer Direto (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM *
Primer Reverso (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM *
DNA Template	≤ 11,5 µL	-
Nuclease-free water		q.s.p. 25 µL
Volume Total	25 µL	-

***A concentração ótima dos primers em reações PCR em Tempo Real pode variar entre 0,1 µM e 0,5 µM.**

Para múltiplas reações, preparar uma mistura principal contendo 2X SYBR Green qPCR Master Mix, Primer Direto, Primer Reverso e H₂O para Biologia Molecular, adicionar o volume correspondente nos microtubos ou poços da microplaca de amplificação e a seguir, adicionar o DNA 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 qPCR.

Notas sobre a otimização da Reação de SYBR Green qPCR:

- Concentração dos Primers

Altas concentrações de primers na reação de SYBR Green qPCR favorecem a formação de produtos de PCR inespecíficos e dímeros de primers (“*primers dimers*”).

Por outro lado, baixas concentrações de primers diminuem a sensibilidade da reação de qPCR.

Assim sendo, caso necessário, otimizar a reação de SYBR Green qPCR utilizando as seguintes concentrações de primers: 0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM, 0,4 µM e 0,5 µM.

4. Controle de Qualidade

Cada lote do kit SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX é avaliado em reações de PCR em Tempo Real seguindo o protocolo descrito neste manual (Protocolo de qPCR em 2 etapas) para a amplificação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humano (GAPDH) a partir de 10ng de DNA genômico humano.

A análise do ensaio de qPCR em tempo real deverá demonstrar a detecção do gene GAPDH com Ct (cycle threshold) < 30 e a ausência de produtos de PCR inespecíficos e dímeros de primers na Curva de “Melting” da reação de qPCR.

Produto para uso em pesquisas científicas.

5. Armazenamento

Armazenar a -20°C e Transportar a -20°C.

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 as embalagens estão danificadas ou se há vazamento.
- Produto de uso apenas laboratorial e deverá ser armazenado em condições próprias para uso em laboratório.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

7. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **SYBR Green qPCR Master Mix LOW ROX** por ela fornecida 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 20.951/1

9. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br