



## 1. NOME COMERCIAL

IBMP MixFit I – MasterMix OneStep

## 2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ  
– IBMP - CNPJ: 03.585.986/0001-05  
RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775 |  
CEP 81350-010 - CURITIBA – PARANÁ – BRASIL  
Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267  
Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às  
16:30 (exceto feriados)  
sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

## 3. APRESENTAÇÃO

Conjunto de reagentes suficiente para 96 reações.

## 4. FINALIDADE

Este produto se destina ao uso em ensaios de RT-qPCR para detecção de material genético extraído de amostras de diferentes alvos.

## USO EXCLUSIVO EM PESQUISA (RUO – RESEARCH USE ONLY)

## 5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por equipe técnica com conhecimento em biologia molecular.

## 6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -15°C. A temperatura indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 30°C.

A manipulação do conteúdo de cada módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

## 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O IBMP MixFit I – MasterMix OneStep utiliza a técnica da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

A reação de RT-qPCR permite a detecção de sequência nucleotídica específica em RNA extraído de organismos diversos. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA extraído da amostra biológica) seguida da qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O IBMP MixFit I – MasterMix OneStep permite a avaliação de amostras de RNA, através da amplificação de alvos

moleculares. A detecção da presença de ácidos nucleicos é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo (oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em reação *singleplex* ou *multiplex*.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Sugere-se o uso de um controle interno para avaliação da qualidade das amostras e/ou da extração.

## 8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de diferentes alvos.

### 8.1 Extração de RNA

Deve-se realizar a extração do RNA das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter RNA cuja qualidade e integridade permita a avaliação da amostra.

### 8.2 Cuidados no armazenamento e manuseio do RNA extraído

- RNA extraído deve ser armazenado entre -80°C e -15°C;
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear bactérias e fungos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;
- Manter os tubos contendo RNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

## 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O IBMP MixFit I – MasterMix OneStep é composto por:

- 01 microtubo de Mistura de PCR (IBMP MM II 4x) contendo 500 µL;
- 01 microtubo de enzima IBMP RTFit III contendo 50 µL;
- 01 microtubo de enzima IBMP TaqFit I contendo 40 µL;

### 9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Água nuclease free;
- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vórtex;
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;

- Centrífuga para placas de 96 posições;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, touca, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);
- Iniciadores e sondas;
- Kit de extração de RNA;
- Micropipetas de precisão (Indicar os volumes necessários);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas livre de RNases e DNases, com filtro;
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Referência Passiva, quando aplicável;
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0 mL.

## 10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até 5 ciclos de descongelamento, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas.

## 11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

No momento do uso, os reagentes e amostras de RNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.

## 12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componente do teste que estejam vencidos;
- A utilização das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras de RNA no interior de cabines tipo PCR *workstation*.

## 13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

### 13.1 Preparo da mistura de reação

- Identificar o número de reações a serem realizadas;



- Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes sugeridos para realização da corrida;

**OBS:** Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 1. Protocolo sugerido para preparo da mistura de reação do IBMP MixFit I – MasterMix OneStep.

Componente	Volume para uma reação
IBMP MM II 4x (Mistura de PCR)	5 µL
IBMP RTFit III (Transcriptase Reversa)	0,5 µL
IBMP TaqFit I (Taq DNA Polimerase)	0,4 µL
Iniciadores*	Conforme padronizado pelo usuário
Sondas*	
Amostra de RNA extraído*	
Referência passiva (opcional)**	
Água nuclease free	q.s.p. <sup>1</sup> 20 µL

\*: Os volumes/concentrações de iniciadores, sondas e RNA podem variar para diferentes ensaios. Portanto, devem ser estipulados pelo usuário;

\*\* : Reagente opcional não fornecido com o IBMP MixFit I- MasterMix OneStep;

<sup>1</sup>: Quantidade suficiente para completar o volume da reação.

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustado ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (spin);
- Distribuir a mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, seguindo o mapa da placa de reação;
- Selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

### 13.2 Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar a amostra de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (spin).

### 13.3 Termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra;
- Configurar as fluorescências para cada canal de acordo com os fluoróforos presentes nas sondas;
- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE (não há a presença de ROX no IBMP MixFit I) ou conforme adicionado pelo usuário no preparo da reação;

- Os parâmetros de termociclagem são sugeridos como um guia e pode ser modificado para melhores resultados;

Tabela 2. Sugestão de termociclagem para o IBMP MixFit I – MasterMix OneStep.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Transcrição reversa	50°C	15 minutos	01
Ativação da Taq DNA Polimerase	95°C	3 minutos	01
Desnaturação	95°C	15 segundos	40
Anelamento e extensão	60°C*	1 minuto	

\*: Estágio para captura de fluorescência.

- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

### 14. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nesta Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucléico proveniente de outras fontes deve ser mitigado por meio da adoção de boas práticas de laboratório;
- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- Realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de misturas de reação e a etapa de PCR em áreas

físicas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e do ambiente;

- Recomenda-se realizar o monitoramento periódico das instalações laboratoriais para garantir que não haja contaminação ambiental por ácidos nucleicos ou produtos de PCR que possam levar a resultados falsos.

### 15. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinados ao tratamento adequado de acordo com a legislação vigente local.

### 16. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO COMERCIAL

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e condições de armazenamento dos insumos;
- Devem ser utilizados instrumentos de medição e detecção calibrados e/ou qualificados, sempre que aplicável;
- As condições de coleta e armazenamento de material impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo IBMP MixFit I – MasterMix OneStep.