



1. NOME COMERCIAL

IBMP MixFit II – MasterMix

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 ensaio 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 dos reagentes deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O conjunto IBMP MixFit II – MasterMix utiliza a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas, em DNA extraído de organismos diversos, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O IBMP MixFit II – MasterMix permite a avaliação de amostras de DNA, 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 DNA extraído de diferentes alvos.

8.1 Extração de DNA

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

8.2 Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA OU RNA extraído

- DNA extraído deve ser armazenado entre -80°C e -15°C;
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA 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 DNA 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 conjunto IBMP MixFit II – MasterMix é composto por:

- 01 microtubo de Mistura de PCR (IBMP MM II 4x) contendo 500 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 DNA;
- 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

Esse é um produto de uso múltiplo.

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 DNA 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 DNA 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 apresentado 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 II - MasterMix.

Componente	Volume para uma reação
IBMP MM II 4x (Mistura de PCR)	5 µL
IBMP TaqFit I (Taq DNA Polimerase)	0,4 µL
Iniciadores*	Padronizado pelo usuário
Sondas*	
Amostra de DNA extraído*	
Referência passiva (opcional)**	
Água nuclease free	q.s.p. ¹ 20 µL

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

** Reagente opcional não fornecido com o IBMP MixFit II – MasterMix;

¹: 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

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar a amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo ótico;
- 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 II) 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 II - MasterMix.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
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 arbitrários.

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 do material impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo conjunto IBMP MixFit II - MasterMix.