

Instrução de Uso - IBMP Mastermix RT-qPCR 4X

IU-RUO-001

Revisão: 02

1. NOME COMERCIAL

IBMP Mastermix RT-qPCR 4X.

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

O produto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X possui formato de apresentação comercial contendo reagentes para 200 reações.

4. FINALIDADE

Este produto é destinado à síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA por transcrição reversa, seguida da amplificação em tempo real de diferentes alvos.

USO EXCLUSIVO EM PESQUISA (RUO – RESEARCH USE ONLY)**5. USUÁRIO PRETENDIDO**

O produto deve ser usado 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 conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X é destinado para uso com a técnica da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

O produto é um conjunto composto pelos reagentes IBMP MM II, que é um tampão de reação com cofatores enzimáticos e dNTPs, IBMP RT Fit III, que é a enzima Transcriptase Reversa, e IBMP TaqFit I, que é a enzima Taq DNA Polimerase com tecnologia *hot-start*, fornecidos em tubos separados. O usuário deve determinar e adicionar à reação os iniciadores (*primers*) e sondas de acordo com o alvo desejado, além da referência passiva da reação, caso necessário.

A reação de RT-qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas em RNA de diferentes alvos, definidos pelo usuário. Nesta técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir de RNA) seguida da qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR. Esta detecção é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo (oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em reação *singleplex* ou *multiplex*.

O conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR é desenhado para realizar a reação do tipo *One-Step*, integrando a transcrição reversa e a amplificação em uma única etapa.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. É sugerido 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 de diferentes alvos, definidos pelo usuário.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X é composto por:

- 02 microtubos de IBMP MM II (Tampão de Reação) contendo 550 µL;
- 02 microtubos de IBMP RT Fit III (enzima Transcriptase Reversa) contendo 60 µL;
- 02 microtubos de IBMP TaqFit I (enzima Taq DNA Polimerase *hot-start*) contendo 50 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;
- 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;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- 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

Este 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 RNA 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, de acordo com os volumes sugeridos na Tabela 1 ou conforme determinado pelo usuário, os volumes para realização da reação, considerando que o componente IBMP MM II está na concentração 4X e seu uso é recomendado na concentração final de 1X.

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

Tabela 1. Sugestão de protocolo para preparo da mistura de reação com o conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X, considerando um volume final de 20 µL.

Componente	Volume para uma reação
IBMP MM II	5 µL
IBMP RT Fit III	0,5 µL
IBMP TaqFit I	0,4 µL
Iniciadores ¹	Conforme padronizado pelo usuário.
Sondas ¹	
Amostra de RNA ¹	
Referência passiva (opcional) ²	
Água livre de nucleases	q.s.p. ³ 20 µL

¹ Os volumes e concentrações de iniciadores, sondas e RNA podem variar para diferentes ensaios e devem, portanto, ser determinados pelo usuário.

² Componente opcional não fornecido.

³ Quantidade suficiente para completar o volume da reação em que a concentração final do componente IBMP MM II seja 1X.

- 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 determinados, ajustados 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 as amostras de RNA nos poços correspondentes na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme o 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 determinadas pelo usuário;
- Selecionar a referência passiva, se aplicável;

OBS.: Não há referência passiva no conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X.

- Configurar os parâmetros de termociclagem de acordo com a sugestão na Tabela 2 ou conforme definido pelo usuário.

Tabela 2. Sugestão de termociclagem para o IBMP Mastermix RT-qPCR 4X

Etapas	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, armazenamento e preparo do RNA alvo impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo conjunto IBMP Mastermix RT-qPCR 4X.