

## Mycoplasma Kit – SybrGreen Rox

### 100 Reações

**Código: 13-200RTMYC**

Armazenamento: -20°C

#### Descrição:

O kit Mycoplasma *SybrGreen qPCR Master Mix ROX* é recomendado para ensaios quantitativos de PCR (qPCR) na detecção de amostras contaminadas com *Mycoplasma*. Esta mix é composta do fluoróforo SybrGreen, a enzima recombinante *HotStart Taq DNA Polymerase* e *primers* correspondentes.

Os Micoplasmas (Mollicutes) são importantes agentes adventícios amplamente encontrados em diferentes tipos de substratos biológicos, porém são de difícil detecção através do exame direto (cultura), o qual requer um longo prazo para os resultados. A contaminação dos cultivos celulares por Mollicutes é freqüente nos laboratórios, incluindo os da indústria farmacêutica e de vacinas. Este kit de PCR identifica um marcador da subunidade 16S do rRNA de *Mollicutes*

**Componentes:** Cada kit contém reagentes suficientes para 100 reações com volume final de 25 µL por reação.

Cód. N°.	13-200RTMYC	100 reactions
1,25 mL	2X Mycoplasma Sybr Green qPCR Master Mix ROX	D.A.
20 µL	Hot Start Taq DNA Polymerase	D.A.
50 µL	Amostra positiva	D.A.
100 µL	Mix de primers MGSO/GPO3	D.A.

**Protocolo:** Este protocolo indica as concentrações sugeridas para um volume final de 25 µL. Contudo, estes volumes podem ser modificados, de acordo com os ensaios de cada pesquisador.

1. Descongelar os componentes, em temperatura ambiente. Quando descongelados, preparar a mix de reação contendo; 2X Sybr Green Master Mix rox e os *primers* para amplificação da região alvo. Misturar no vórtex e após centrifugar rapidamente para coletar todo o volume da reação no fundo do tubo. Para manter os componentes viáveis permanecer com os tubos no gelo.

2. Preparar a *mix* de reação como a seguir:

Componente	Volume	Conc. Final
2X SybrGreen qPCR Master Mix ROX	12.5 µL	1X
Primers Forward /Reverse (10 µM)	1.0 µL	0.4 µM (0.1–0.5 µM)
Hot Start Taq DNA Pol (5U/µL)	0.2 µL	1U
DNA amostra (controle)	2µL	
Água ultrapura q.s.p.	25 µL	

#### Parâmetros de amplificação recomendados:

##### 2-Protocolo *step cycling*

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Hold	Desnaturação inicial	95°C	2 min
30 cycles	Desnaturação	95°C	15 sec
	Anelamento e extensão	55°C (data collection)	30 sec*
Curva de <i>Melting</i> (dissociação)		Proceder de acordo com cada equipamento	

\* O tempo de extensão é dependente do tamanho do *amplicon*. Alguns *primers* podem precisar de uma etapa adicional de ciclagem para um melhor desempenho.

##### 3- Protocolo *step cycling*

Stage	Step	Temperatura	Tempo
Hold	desnaturação Inicial	95°C	15 min
30 cycles	Desnaturação	95°C	15 sec
	Anelamento	55°C	30 sec
	Extensão	68°C – 72°C (data collection)	30 sec
Curva de <i>Melting</i> (dissociação)		Proceder de acordo com cada equipamento	

#### Ensaio de Controle da Qualidade

Este kit tem sido testado funcionalmente em ensaios de qPCR utilizando equipamentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e Line Gene 9600 Bioer, seguindo os procedimentos descritos nesta ficha (protocolo de ciclagem 2-passos) para a detecção de amostras contaminadas com *Mycoplasma*, a partir de 20 ng de DNA genômico como *template*.

A análise de ensaio de qPCR em tempo real deve demonstrar a detecção do *Mycoplasma* com um CT (limiar de ciclo) <30. Para o TM espera-se que o maior pico apareça entre 80-84°C (Figura1).

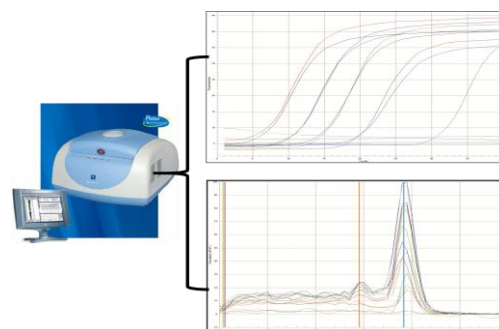


Figura 1. TM das amostras positivas para *Mycoplasma* spp