

RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX

Cód: K7.2
Versão: 1/2025

1- Descrição

O kit **RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX** reúne todos os componentes necessários para a conversão de RNA em cDNA de fita simples, catalisada pela enzima transcriptase reversa (etapa 1), e para a reação de qPCR, conduzida pela enzima Taq DNA polimerase, utilizando o cDNA gerado na etapa anterior como molde (etapa 2). Com o **kit RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX**, todo o processo ocorre em um único tubo (*One-Step*), reduzindo a manipulação e o risco de contaminação entre amostras. Utiliza a enzima RT M-MLV recombinante e a enzima Taq DNA polimerase recombinante. Contém corante de referência ROX, para normalização da fluorescência.

Atenção! Este kit não contém primers e sondas utilizados na metodologia TaqMan.

2- Apresentação

Composição	Código
RT-qPCR TaqMan One-Step Buffer (2X)	R10
Mix de Enzimas	Z7
Água Ultrapura	S3
ROX Reference Dye (25 µM)	R18

3- Condições de armazenamento e transporte

- O Kit **RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX** pode ser transportado refrigerado em gelo gel ou em temperaturas inferiores. Manter ao abrigo da luz e umidade.

- A temperatura de armazenamento deve ser de -20 °C ou inferior.

4- Medidas de segurança

Para informações sobre biossegurança e orientações em casos de acidentes com o produto, consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS), disponível por meio do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) da Phoneutria Biotecnologia e Serviços. O contato pode ser feito pelo e-mail **pht@phoneutria.com.br** ou pelos telefones **(31) 99585-3050** e **(31) 3427-6413**.

RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX

Cód: K7.2
Versão: 1/2025

5- Protocolo – RT-qPCR One-Step TaqMan +ROX

ATENÇÃO, mantenha o Mix de enzimas no freezer até o momento do uso. Ao retirar o mix, coloque-o no gelo.

1. Prepare uma reação com volume final de 20 µL adicionando os seguintes reagentes:

Reagente	Volume
RT-qPCR TaqMan One-Step Buffer (2X)	10 µL
Primer Forward (Concentração de 5 a 10 µM)	1 µL
Primer Reverse (Concentração de 5 a 10 µM)	1 µL
Sonda (Concentração de 2,5 a 5 µM)	1 µL
Mix de Enzimas	1 µL
ROX Reference Dye (25 µM)*	0,04 µL ou 0,4 µL
RNA purificado	1 a 5,6 µL
Água Ultrapura	Completar o volume para 20 µL

*Utilize a concentração de ROX Reference Dye indicada para o seu termociclador: 0,04 µl = 50nM / 0,4 µl = 500nM.

2. A reação pode ser incubada com os tempos e temperaturas exemplificados na tabela abaixo. Utilize o programa de ciclagem com as temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão bem como o número de ciclos padronizados para sua reação.

5.1 Exemplo de ciclagens para RT-qPCR One-Step TaqMan + ROX

Temperatura	Tempo	Observação	
50 °C	10-30 min	Síntese do cDNA	
95 °C	2 min	O primeiro passo de desnaturação deve ter um tempo e temperatura maior para desfazer o anelamento do RNA com o cDNA.	
92 °C	15-30 s	Repetir 40-45x	Segundo passo de desnaturação.
50-60 °C	15-30 s		Anelamento dos primers e sonda no DNA alvo.
72 °C	20-30 s		Extensão com ação da Taq DNA pol. A fluorescência deve ser coletada nesse passo.

Ou

Temperatura	Tempo	Observação	
50 °C	10-30 min	Síntese do cDNA	
95 °C	2 min	O primeiro passo de desnaturação deve ter um tempo e temperatura maior para desfazer o anelamento do RNA com o cDNA.	
92 °C	15 s	Repetir 40-45x	Segundo passo de desnaturação.
60-63 °C	60 s		Anelamento dos primers e sonda no DNA alvo
			Extensão com ação da Taq DNA pol. A fluorescência deve ser coletada nesse passo.