

ORIENTAÇÕES RÁPIDAS P/ PREPARO DO MIX ALLPLEX (SEEGENE) PARA PCR

PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO PARA EXECUÇÃO

- Todos os procedimentos aqui descritos devem ser realizados na sala de preparo do mix;
- Reservar gelo na caixa de isopor pequena;
- Realizar a limpeza e desinfecção com álcool 70% das superfícies da capela de fluxo e dos itens que permanecerão na capela durante o preparo do mix;
- Ligar a luz UV durante 15min;
- Calcular o número de reações (**R**), considerando a seguinte fórmula:
 - a) Se o número de amostras (**n**) + controles for menor ou igual a 14: **R = n + 1**;
 - b) Se o número de amostras (**n**) + controles for maior ou igual a 15: **R = n + 2**;
- Calcular o volume necessário de cada reagente para o preparo dos *mix* (tabela 1).

Tabela 1: Preparação dos *mix* para PCR do kit Allplex.

Reagente	Tubo Mastermix
2019-nCoV MOM	R x 5 µl
Água livre de RNase	R x 5 µl
5X <i>Real-time One-step Buffer (Tampão)</i>	R x 5 µl
<i>Real-time One-step Enzyme (Enzima)</i>	R x 2 µl
Volume total	R x 17 µl

- Descongelar os reagentes do kit (2019-n MOM, Água livre de RNase, 5x Real-time One-step Buffer). **Obs.:** A enzima (enzime mix) deve ser mantida no gelo;
- Confeccionar os desenhos da placa em impresso próprio preenchendo o número da placa, data e a identificação dos controles e amostras com número de registro interno e iniciais dos pacientes.

PREPARAÇÃO DO MIX PARA PCR

- 1- Utilizar luvas novas e sem talco;
- 2- Inverter cada reagente 5x para correta homogeneização;
- 3- Rotule 1 eppendorfs de 1,5ml como MIX;
- 4- Preparar os *mix* para PCR pipetando os reagentes na ordem indicada na tabela 1;
- 5- Ao final da preparação dos *mix*, homogeneizar o tubo por inversão (5x);
- 6- Fazer descer as gotas da tampa dos eppendorfs fazendo um movimento vigoroso ou por centrifugação breve.

MONTAGEM DA PLACA DE PCR

- 1- Caso haja a possibilidade de ter contaminado suas luvas, trocá-las por luvas novas;

- 2- Ainda na capela de fluxo, posicionar uma placa de PCR sobre o suporte de placas. **Obs.:** Toque sempre nas laterais da placa, nunca tocar o fundo dos poços;
- 3- Pipetar **17 µl** dos *mix* de PCR na seguinte disposição, de acordo com o número de amostras e controles:

**Figura 1: Disposição dos mix de cada primer numa placa de 48 poços.
Exemplo para quando houverem 6 amostras e 2 controles.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
B	A12	(...)										
C												
D												
E												
F												
G												
H												CP

CN: Controle Negativo; A: Amostra; CP: Controle Positivo.

- 4- Pipetar **8 µl** de água livre de RNase no poço para controle negativo (CN) (Figura 1);
- 5- Após essa etapa, tampar a placa e seguir para a bancada de montagem da placa de PCR (Area 3)
- 6- Pipetar **8 µl** das amostras e controle positivo conforme desenho da placa previamente elaborado;
- 7- Selar a placa com filme apropriado;
- 8- Centrifugar a placa a 800 g por 1 minuto.
- 9- Levar a placa para o aparelho termociclador CFX9 - BioRad.

Após montar a placa de PCR e colocá-la no termociclador, organizar e limpar com álcool 70% a capela de fluxo da sala de preparo do mix.