

EQ  CIÊNCIA E HUMANISMO	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP EQ 023
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Termociclador Real Timer Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Edição	Alteração
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 050; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: Suely Aparecida Pinheiro Palomino Biologista	27/07/2015	Aprovado por: Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi Pesquisadora	15/03/21
--	------------	--	----------

EQ 	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP EQ 023
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Termociclador Real Timer Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Padronizar o procedimento para uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time Polimerase Chain Reaction, PCR) utilizando o equipamento StepOne Plus., garantindo também proteção ao operador e ao ambiente contra agentes biológicos de risco.

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiários

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que utilizarem o Equipamento.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 Este equipamento é capaz de submeter uma reação de PCR (fragmento a ser amplificado+reagentes) a vários ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada protocolo padronizado ou para se estabelecer uma padronização de um protocolo, através de um gradiente de temperatura, pois o mesmo comporta realizar, numa mesma ciclagem, diferentes temperaturas de anelamento da mesma sequência-alvo de oligonucleotídeos em tempo real.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 Equipamento.. : Figura 01



EQUIPAMENTO: Termociclador (Real Time PCR Systems nº57
MOD.: StepOne Plus **MARCA:**Applied Biosystems
VOLT.:110V **Nº DE SERIE:**272003472
PAT.:HC 14468 sala 42

EQ 	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP EQ 023
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Termociclador Real Timer Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.1.2 Observações importantes

- 6.1.2.1 O StepOne Plus fica constantemente ligado em modo “stand-by”, no nobreak situado ao seu lado, e assim deve permanecer.
- 6.1.2.2 As calibrações dos equipamentos são realizadas periodicamente (a cada 18 meses), seguindo o cronograma e as especificações necessárias, determinadas pelo fabricante do equipamento.
- 6.1.2.3 A validade da calibração pode ser consultada no próprio software do equipamento, acessando a aba “Instrument Maintenance Manage

6.2 Procedimentos

Figura 02 - StepOne Plus Real Time PCR Systems e computador acoplado



Figura 03 - Gaveta aberta para receber a placa de 96 poços com a reação/PCR



- 6.2.1 Ligar o computador ao lado StepOne Plus (Figura 02). Ao ligar o computador, digite CTRL+ALT+DEL, pressione OK e coloque o Username: INSTR-ADMIN e o password: INSTR-ADMIN. Puxe a gaveta colocando a mão na parte inferior da parte da frente do equipamento e coloque a placa de reação já centrifugada (Figura 02).
- 6.2.2 Feche a gaveta empurrando-a até um “clique” final. Importante: tanto para abrir quanto para fechar, a gaveta é um pouco resistente.
- 6.2.3 Abra a versão 2.2 do software do StepOne Plus no computador acoplado ao equipamento. Abrirá uma janela de login onde o username é “GUEST”. Clique em: “login as a guest” e pressione a tecla “OK”
- 6.2.4 Clique na tecla “New Experiment”. Dê um nome para o seu experimento em “Experiment Name”. Selecione a opção “StepOne Plus Instrument (96Wells)”
- 6.2.5 Selecione o tipo de experimento que você irá realizar: Quantificação, Genotipagem ou Presença/Ausência – Clique em “Next”. De acordo com a escolha de experimento feito no

EQ 	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP EQ 023
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Termociclador Real Timer Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

item anterior, prossiga selecionando as opções correspondentes de cada experimento. Sempre se lembrando de verificar o tipo método de detecção (TaqMan, Sybr Green, entre outros) e o volume da reação que está utilizando.

- 6.2.6 Salve o experimento e Clique em “Start” para começar a corrida. Após a corrida ter terminado, vá até a aba “Export”, opção “Export” e os resultados podem ser exportados em formato Excel. Escolha na opção “Browse” o local onde deseja salvar os valores de Cycle threshold (Ct) de cada pocinho. Caso queira salvar algum outro resultado, como gráficos, por exemplo, selecionar e pedir para exportar e salvar

6.3 Dados complementares

- 6.3.1 Utilização de controle(s) positivo(s), controle negativo, na reação, utilização de água Milli-Q para reação colhida no momento de preparo da reação,.

- 6.3.2 Para que uma reação seja considerada válida, deve ser avaliado:

- 6.3.2.1 Duplicata ou Triplicata (Desvio padrão ≤ 0.4 ou $< 1Ct$), Padrão da curva de amplificação, que deverá estar em formato exponencial, quando está visualizada em modo logaritmo (Figura 04)

- 6.3.2.2 Padrão da curva de dissociação (*Melting Curve*), que deverá ter um pico único para todas as amostras. Este tipo de curva é verificado quando se utilizada na reação de PCR em tempo real, apenas o par de *primers*, sem uma sonda específica marcada com fluoróforo (Figura 05). Verificar na aba “Analysis” os gráficos de emissão de fluorescência

Figura 04 - Gráfico de amplificação de uma reação de PCR em tempo real

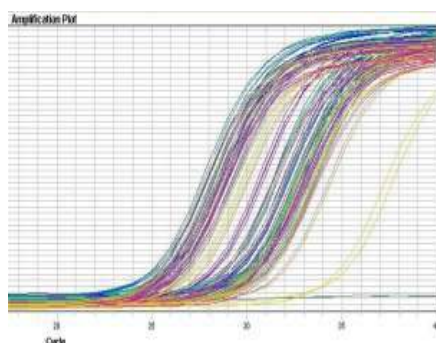
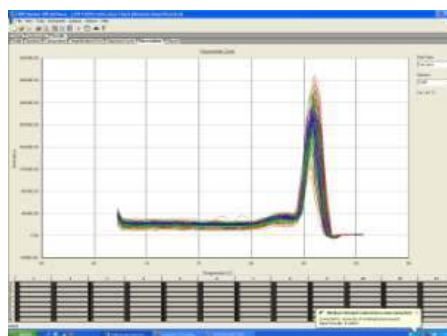


Figura 05 - Gráfico de dissociação de uma reação de PCR em tempo real



EQ 	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP EQ 023
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Termociclador Real Timer Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.3.2.3 Multicomponent Plot: verifica a emissão de fluorescência ROX, que é a fluorescência padrão (passiva) do equipamento. O ROX serve de normalizador da sua reação. Quanto mais próximo as curvas das suas amostras estiverem, melhor é o resultado
- 6.3.2.4 Raw data plot: verifica a emissão de fluorescência de cada filtro, por comprimento de onda. Quanto mais próximo as curvas das suas amostras estiverem, melhor é o resultado. Interferências:
- 6.3.2.5 Dependente da qualidade da amostra: processamento, extração ou isolamento, estocagem e armazenamento, transcrição reversa e o próprio preparo da reação do PCR. Possível queda de energia por tempo prolongado enquanto o equipamento está em funcionamento. O no-break tem capacidade de segurar por aproximadamente 30 minutos.

6.4 **Limpeza**

- 64.1 Após a utilização do aparelho passar uma gaze com álcool 70°C em todo o aparelho. Conservar o local limpo e guardar todo o material utilizado

6.5 **EPIS : Usar avental e luvas**

7. **FLUXOGRAMAS**

- 7.1 Não aplicável.

8. **ANEXOS**

- 8.1 Não aplicável.

9. **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

- 9.1 Manual do Termociclador (Real Time PCR Systems, marca Applied Biosystems).