



NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

NewGene AMPVamp

Para detecção do RNA de Metapneumovírus Aviário A e B (AMPVA e AMPVB) pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, precedida da transcrição reversa (RT-PCR) a partir de amostras previamente processadas com **NewGene Prep** e **NewGene**

Preamp. A reação RT-qPCR transcreve fragmentos de RNA em cDNA usando a enzima M-MLV e amplifica por meio da enzima Taq polimerase, combinando primers e sonda marcada com o cDNA específico. O sistema é baseado na detecção em tempo real do sinal fluorescente emitido pela sonda degradada durante a polimerização, que é proporcional ao acúmulo de produtos durante a reação.

Componentes

Componente	Composição	Quantidade
Mastermix AMPVamp	Tampão, dNTP's, DTT, água, primers e sonda	4 tubos
Enzima RTTaq	Taq polimerase + MMLV	1 tubo

* Cada tubo corresponde a 25 reações. **Cada kit é próprio para 100 reações.**

** O fracionamento resultará em perda do total de reações do kit.

Equipamentos e insumos não fornecidos

- Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL;
- Termociclador p/ PCR;
- Micropipetas de volumes variados;
- Banho-maria;
- Agitador de tubos tipo vórtex;
- Ponteiras com barreira descartáveis;
- Placas para reação de PCR;
- Filme plástico para vedação da placa;
- Estante para placa;
- Álcool 70% (assepsia);
- Luvas de procedimento sem talco.

Transporte, estocagem e estabilidade

O transporte é realizado preferencialmente sob refrigeração em gelo artificial, não afetando o desempenho dos produtos.

Após o recebimento, os reagentes devem ser conservados em freezer.

IMPORTANTE: O mastermix contém componente – **sonda** – degradável pela luz.

Período de validade

Os componentes do **NewGene AMPVamp** são estáveis por 1 ano a partir da data de fabricação impressa, respeitadas as condições de armazenagem descritas anteriormente.

Indicação

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Utilização

Atenção - sempre considere o texto da bula que acompanha o produto.

Manter as **amostras** e o **Mastermix** na bancada até que alcancem temperatura próxima à ambiental.

Verificar se o banho-maria está a 60°C (± 5°C).

Retirar a enzima RTTaq do freezer e acondicioná-la em caixa de isopor com gelo durante o uso.

Limpar a bancada com álcool 70% antes do início das atividades e colocar luvas de procedimento sem talco.

Preparo do mastermix

Fracionar o mastermix e adicionar o volume de enzima de acordo o número de reações a serem preparadas, conforme tabela a seguir:

Componente	1 reação**	8 reações	25 reações
Mastermix AMPVAmp	27,75µL	222µL	693,75µL
RTTaq	0,25µL	2µL	6,25µL
Amostra	2µL	2µL*	2µL*

*Por reação

** Valor apresentado para fins de cálculo. Não é recomendado preparar menos de 8 reações, devido a perda de volume e possíveis erros de pipetagem.

Após a adição da enzima ao mastermix, vortexar e centrifugar por 30s a 10.000rpm.

Em seguida, aliquotar **28µL** nos tubos ou placas para PCR em tempo real.

Após o preparo do mix, armazenar os tubos ou placas sob refrigeração (não congelar), pelo menor tempo possível.

Não congelar após a adição da enzima.

Amplificação

- Vortexar e colocar o produto de extração advindo da aplicação de NewGene Preamp no banho a 60°C ou 90°C ± 5°C (conforme for mais adequado à rotina do laboratório), por 5 minutos.
- Submetê-lo a choque térmico: transferir imediatamente para uma caixa de isopor com gelo.
- Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm, para separar a amostra da sílica.
- Aplicar **2 µL** de amostra na placa para amplificação.
Importante: este volume deve ser retirado da fase líquida, evitando o arraste de sílica para o Mastermix. Preservar o volume não utilizado das amostras no freezer para eventual reteste.
- Após o término das aplicações, fechar a placa e retirar as bolhas (tomando o cuidado para que não subam gotas para a tampa).
- Acondicionar a placa no termociclador em tempo real, identificar amostras, NTCs e Standards no programa e salvar o documento.
- Utilizar os seguintes marcadores:

<i>Reporter</i>	<i>Quencher</i>
AMPV-A - FAM	IOWA BLACK FQ (None)
AMPV-B - HEX (VIC)	IOWA BLACK FQ (None)

Importante: caso seu equipamento trabalhe com referência passiva, **não** selecione a opção ROX.

- Iniciar corrida no termociclador, conforme especificado abaixo:

Transcrição reversa: 45°C por 30 min.....		
Desnaturação inicial: 95°C por 3 min.....		
40 ciclos:	Desnaturação: 95°C por 15s	Anelamento: 60°C por 60s

Avaliação

- Após término da corrida no termociclador, selecionar a detecção da sonda adequada e definir o *Baseline*.
- Posicionar o *Threshold* em um ponto em que as curvas ascendentes de amplificação apresentem-se paralelas.
- Análise, conforme o software de seu termociclador, e registre os resultados:
POSITIVO: presença de leitura (CT)
NEGATIVO: ausência de leitura (invalid)
Obs.: Amostras com curvas de amplificação com CT acima de 37 devem ter resultado considerado como negativo, devido ao limite da técnica.
- Seguir passos 1 a 3 para cada uma das sondas presentes no mastermix **NewGene AMPVAmp**.

Para informações adicionais a respeito da avaliação de resultados de PCR em tempo real, clique neste link, ou acesse o site www.simbios.com.br/interpretacao-dos-resultados-191.

Suporte Técnico

Para assistência técnica e maiores informações, entrar em contato com nosso Suporte Técnico pelo e-mail sac@newgene.com.br, pelo site www.newgene.com.br ou pelo telefone (51) 3074-7400.

Responsável Técnico: Luciane Dubina Pinto – CRMV-RS6694

V9.09/24