



NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

## NewGene FIVamp - RT-qPCR

Para detecção do RNA do Vírus da Imunodeficiência Felina (virion) 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 FIVamp - RT-qPCR	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% (asepsia);
- 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 FIVamp - RT-qPCR 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 ( $\pm$  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:

Simbios Produtos Biotecnológicos Ltda  
Rua Caí, 541 - Bairro Vila Princesa  
Izabel  
94940-030 - Cachoeirinha - RS  
[simbios.com.br](http://simbios.com.br) [newgene.com.br](http://newgene.com.br)

Fone: 51 3074 7400  
CNPJ 95.237.301/0001-40  
Inscrição Estadual: 177/0189987  
Inscrição Municipal: 138585



Componente	1 reação**	8 reações	25 reações
<b>Mastermix FIVAm - RT-qPCR</b>	27,75µL	222µL	693,75µL
<b>RTTaq</b>	0,25µL	2µL	6,25µL
<b>Amostra</b>	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: **HEX (VIC)** como *Reporter* e **ZEN-IOWA BLACK (None)** como *Quencher*.

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

- Iniciar corrida no termociclador, conforme especificado abaixo:

<b>Transcrição reversa:</b> 37°C por 30 min.....		
<b>Desnaturação inicial:</b> 95°C por 3 min.....		
<b>40 ciclos:</b>	<b>Desnaturação:</b> 95°C por 15s	<b>Anelamento:</b> 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.

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](http://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](mailto:sac@newgene.com.br), pelo site [www.newgene.com.br](http://www.newgene.com.br) ou pelo telefone (51) 3074-7400.