



NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

NewGene IBDVAmp

Para detecção do RNA do Vírus da Doença de Gumboro (IBDV) 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 IBDVAmp	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 IBDVAmp** 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 95°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 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
Mastermix IBDVAmp	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 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: **FAM** como *Reporter* e **IOWA BLACK FQ (None)** como *Quencher*.
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.

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

V7.09/24