NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

NewGene IBDVSeq
Para amplificação do RNA do Vírus da Doença de Gumboro (IBDV) pela Reação em Cadeia da Polimerase, 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.

Componentes

Componente	Composição	Quantidade
1º Amplificação (RT-PCR)		
Mastermix IBDVSeq – 1º Amplificação (RT-PCR)	Tampão, dNTP's, DTT, água e primers	4 tubos*
Enzimas	Taq polimerase + MMLV	1 tubo
Nested		
Mastermix IBDVSeq – Nested	Tampão, dNTP's, água e primers	4 tubos*
Enzima	Taq polimerase	1 tubo
Primers	Primer 1 e Primer 2	2 tubos

* 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.

Período de validade

Os componentes do **NewGene IBDVSeq** 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 as enzimas RTTaq ou Taq, conforme etapa a ser executada, do freezer e acondicioná-las 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.

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

SIMBIOS BIOTECNOLOGIA

1º Amplificação

Preparo mastermix 1º Amplificação
Fracionar o mastermix e adicionar o volume de enzima de acordo o número de reações a serem preparadas, conforme tabela a seguir:

Componentes	1 reação*	8 reações	25 reações
Mastermix IBDVSeq – 1º Amplificação (RT-PCR)	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.
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 90°C (± 5°C) por 5 minutos.
Submetê-lo a choque térmico: transferir imediatamente para uma caixa de isopor com gelo.
Centrifugá-lo, 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.

Acondicionar a placa no termociclador e iniciar o programa, conforme especificado abaixo:

Transcrição reversa: 45°C por 30 min			
Desnaturação inicial: 95°C por 3 min			
30 ciclos:	**Desnaturação**: 95°C por 20s	**Anelamento**: 50°C por 40s	**Extensão**: 72°C por 60s

A partir desta etapa, proceder ao indicado no item Amplificação Nested IBDVSeq – Nested. No caso do produto da RT-PCR não ser imediatamente encaminhado para amplificação, mantê-las em geladeira até o momento da utilização. Para estocagem de maior prazo, mantê-las a -20°C (freezer).

Amplificação Nested

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

Componente	1 reação*	8 reações	25 reações
Mastermix IBDVSeq – Nested	27,8µL	222,4µL	695µL
Taq	0,2µL	1,6µL	5µL
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.
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 Nested

Aplicar 2 µL do produto da primeira amplificação (RT-PCR) na placa para amplificação.

Importante: Procedimento com alto risco de contaminação de processo. Executar esta etapa em local reservado para utilização de amplicons.
Acondicionar a placa no termociclador e iniciar o programa, conforme especificado a seguir:

Desnaturação inicial: 95°C por 3 min.....			
35 ciclos:	**Desnaturação**: 95°C por 20 s	**Anelamento**: 50°C por 40 s	**Extensão**: 72°C por 60 s

A partir desta etapa, o produto está pronto para ser encaminhado ao processo de purificação e posterior sequenciamento (procedimentos não fornecidos nesta bula). Para estocagem, mantê-lo a -20°C (freezer).

Avaliação

Após a amplificação,
I. Pré-avaliação em eletroforese.
OBS - Caso haja intervalo até a realização da eletroforese, armazenar em geladeira.
RESULTADOS POSITIVOS: presença de banda do tamanho de 579 pb.

RESULTADOS NEGATIVOS: ausência de banda do tamanho especificado acima.

II. Sequenciamento e Alinhamento das sequências para genotipagem em comparação com banco fornecido pela Simbios Biotecnologia para MEGA (solicite!), ou por BLAST com GenBank.

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 ***V9.05/25***