



NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

NewGene ROTACamp

Para amplificação de RNA de Rotavírus suíno tipos A e C pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, precedida da transcrição reversa (RTqPCR) a partir de amostras previamente processadas com **NewGene Prep** e **NewGene Preamp**.

A RT-qPCR utiliza iniciadores específicos – *primers* – e uma sonda marcada com corantes fluorescentes, que se ligam exclusivamente ao DNA alvo. A reação é desencadeada pela ligação dos *primers* e sonda ao DNA alvo e sua subsequente amplificação pela enzima Taq polimerase. O sistema é baseado na detecção, em tempo real, do sinal emitido pela sonda fluorescente no momento da polimerização, que é proporcional ao acúmulo de produtos durante a PCR.

Componentes

| Componente | Composição | Quantidade |
|--------------------|--|------------|
| Mastermix ROTACamp | Tampão, dNTP's, DTT, água, primers e sonda | 4 tubos |
| Enzimas | 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/ qPCR;
- Micropipetas de volumes variados;
- Banho-maria;
- Agitador de tubos tipo vortex;
- 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 ROTACamp** 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.

Simbios Produtos Biotecnológicos Ltda.
Rua Cai, 541 - Bairro Vila Princesa Izabel
94940-030 - Cachoeirinha - RS
Fone: 51 3074 7400
CNPJ 95.237.301/0001-40
Inscrição Estadual: 177/0189987
Inscrição Municipal: 138585



ANTES

- 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 serem preparadas, conforme tabela abaixo:

| Componente | Volume para: | | |
|--------------------|--------------|-----------|------------|
| | 1 reação | 8 reações | 25 reações |
| Mastermix ROTACamp | 27,75µL | 222,0µL | 693,75µL |
| RTTaq | 0,25µL | 2,0µL | 6,25µL |
| Amostra | 2µL | 2µL | 2µL |

Após a adição da enzima ao mastermix vortexar e centrifugar por 30s a 10.000rpm. Em seguida aliquotar **28µL** nos tubos ou placa para qPCR.

Após o preparo do mix, armazenar os tubos ou placa sob refrigeração, pelo menor tempo possível.

Amplificação

1. Vortexar e colocar o produto de extração advindo da aplicação de **NewGene Preamp** no banho a 90°C (± 5°C) por 5 minutos.
2. Submetê-las à choque térmico: transferir imediatamente para uma caixa de isopor com gelo.
3. Centrifugá-lo, por 3 minutos a 10.000 rpm, para separar a amostra da sílica.
4. 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 mix. Preservar o volume não utilizado das amostras no freezer para eventual reteste.
5. Após o término das aplicações, fechar a placa e retirar as bolhas (tomando o cuidado para que não subam gotas para a tampa).
6. Acondicionar a placa no termociclador qPCR, identificar amostras, NTCs e Standards no programa e salvar o documento.
7. Utilizar os seguintes marcadores:

| Alvos | Reporter | Quencher |
|------------------------|----------|----------|
| Rotavirus suíno tipo A | FAM | MGB |
| Rotavirus suíno tipo C | VIC | MGB |

Importante: caso seu equipamento trabalhe com referência passiva selecionar a opção ROX.

8. Iniciar corrida no termociclador, conforme especificado abaixo:

| | | |
|--|-----------------------------|---------------------------|
| Transcrição reversa: 37°C por 30 min | | |
| Desnaturação inicial: 95°C por 3 min | | |
| 40 ciclos: | Desnaturação: 95°C por 15 s | Anelamento: 60°C por 60 s |

Avaliação

1. Após término da corrida no termociclador, selecionar a detecção da sonda adequada e definir o *Baseline*;
2. Posicionar o *Threshold* em um ponto em que as curvas ascendentes de amplificação apresentem-se paralelas.
3. Analise conforme o software de seu termociclador e registre os resultados:
 - **POSITIVO:** presença de leitura (CT)
 - **NEGATIVO:** ausência de leitura (invalid)
4. Seguir passos anteriores para cada uma das sondas presentes em cada mastermix **NewGene ROTACamp**

Suporte Técnico

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

Responsável Técnico: Luciane Dubina Pinto – CRMV-RS6694