NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

NewGene RTPCRAmp
Mastermix 2x utilizado para transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR ou RT-PCR em tempo real) 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 NewGene RTPCRAmp é mastermix universal para reações de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real. A formulação concentrada (2x) é composta de tampão, DTT e dNTP´s para 100 reações (considerando volume de reação de 30µL). Ao mastermix NewGene RTPCRAmp, adicionam-se os primers, sondas (para RT-qPCR), enzima RTTaq, água purificada e o DNA alvo.

NewGene RTPCRAmp proporciona confiabilidade e reprodutibilidade a suas análises pela utilização de reagentes otimizados, além de reduzir o risco de contaminação com mínima manipulação de reagentes.

Componentes

Componente	Composição	Quantidade
Mastermix RTPCRAmp	Tampão, dNTP's, DTT, água	4 tubos*
Enzima	Taq polimerase + MMLV	1 tubo
Água	Água purificada	1 tubo

*Cada tubo corresponde a 25 reações de 30µL. O fracionamento resultará em perda no total de reações do kit.

Equipamentos e insumos não fornecidos

- Agitador de tubos tipo vórtex;
- Banho-maria;
- Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL;
- Álcool 75% (assepsia);
- Estante para placa;
- Luvas de procedimento (sem talco);
- Referência passiva (Rox, CXR Reference, etc);
- Micropipetas monocanal ou multicanal;
- Ponteiras com barreira descartáveis;
- Primers;
- Sondas;
- Termociclador p/ PCR ou qPCR;
- Tubos ou Placas para PCR ou qPCR.

Estocagem e estabilidade

Armazenar os reagentes em freezer. Retirar somente a alíquota de reagente necessária para o teste.

Período de validade

Os componentes do NewGene RTPCRAmp 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 RTTaq do freezer e acondicioná-la em caixa de isopor com gelo durante o uso.
Limpar a bancada com álcool 75% antes do início das atividades e colocar luvas de látex de procedimento.

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

Sugestão de preparo dos componentes para reação com volume final de 30µL
Em cada tubo adicionar os seguintes itens, com exceção da amostra:

Componente	Volume para 1 reação	Concentração final na reação
Matermix RTPCRAmp (2x)	15µL	1X
Enzimas RTTaq	0,25µL	-
primer Forward	*conforme titulação	0,1 - 1,0µM
primer Reverse	*conforme titulação	0,1 - 1,0µM
sonda	*conforme titulação	0,1 – 0,5µM
Amostra	2-5µL	~1-25 ng
Água purificada	q.s.p 30µL	-

Após a adição de todos os componentes, vortexar e centrifugar por 30s a 10.000rpm.
Em seguida, aliquotar em tubos ou placas para PCR ou qPCR.
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.

Obs. 1 - Para PCR convencional (detecção por eletroforese), não é necessário utilizar sonda.
Obs. 2 – A referência passiva, necessária em alguns equipamentos de qPCR, não acompanha o kit.
Obs. 3 – Se utilizadas as 25 reações de um tubo de RTPCRAmp em uma única preparação, considerar, para fins de cálculo, volume total de 390µL.

A sugestão de preparo é uma condição padrão para a amplificação de RNA. As condições ótimas de reação, incluindo a concentração de primers e sonda e os programas de amplificação, devem ser otimizados conforme sua aplicação.

Amplificação

Vortexar e colocar o produto de extração com NewGene Preamp no banho a 60°C (± 5°C) por 5 minutos.
Submeter a choque térmico, transferindo os tubos imediatamente para uma caixa de isopor com gelo.
Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm para separar a amostra da sílica.
Aplicar a amostra na placa para amplificação.

Importante: o 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.
Acondicionar a placa no termociclador convencional ou em tempo real.
Iniciar o programa de amplificação desejado.

Sugestão de programa de amplificação (*modifique conforme sua necessidade*):

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

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 ***V9.06/23***