



NewGene RTPCRamp

Mastermix 2x, utilizado para transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR ou RT-qPCR em Tempo Real), a partir de amostras previamente

NEW GENERATION OF DIAGNOSTICS

processadas com **NewGene Prep** e **NewGene Preamp**.

A RT-PCR é a reação enzimática que transcreve fragmentos de RNA em cDNA com a enzima M-MLV e, ao mesmo tempo, realiza a amplificação com a enzima Taq polimerase através de iniciadores (primers) que se ligam exclusivamente ao cDNA alvo.

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 PCRamp, adicionam-se os primers, sondas (para RT-qPCR), enzimas Taq Polimerase e M-MLV, água purificada e o DNA alvo.

NewGene RTPCRamp proporciona confiabilidade e reprodutibilidade às suas análises com utilização de reagentes otimizados e reduzindo o risco de contaminação com a manipulação reduzida dos reagentes.

Componentes

Componente	Composição	Quantidade
Mastermix RTPCRamp	Tampão, dNTP's, DTT, água	4 tubos*
Enzima	Taq polimerase	1 tubo
	MMLV – RT Reverse Transcriptase	1 tubo
Água	Água purificada	1 tubo

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

Equipamentos e insumos não fornecidos

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

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*.

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



Utilização

Atenção - sempre considere o texto da bula que acompanha o produto.

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 Taq Polimerase 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 acordo com o procedimento.

Sugestão de preparo dos componentes para reação com volume final 30µL

Em cada tubo adicionar os seguintes itens, exceção da amostra:

Componente	Volume para 1 reação	Concentração final na reação
Mastermix RTPCRamp (2x)	15µL	1X
Taq Polimerase (5U/µL)	0,20µL	1,0U
M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µL)	0,05µL	10U
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 nos tubos ou placa para PCR ou qPCR.
- Após o preparo do mix, armazenar os tubos ou placa sob refrigeração, pelo menor tempo possível.

OBS1 - para PCR convencional (detecção por eletroforese) não é necessário utilizar sonda.

OBS2 - a referência passiva não acompanha o kit, a qual é necessária em alguns equipamentos de qPCR.

OBS3 - Se utilizada 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 DNA, porém as condições ótimas de reação, incluindo a concentração de primers e sonda e os programas de amplificação devem ser otimizados conforme sua aplicação.

Amplificação

1. Vortexar e colocar o produto de extração com **NewGene Preamp** no banho à 60°C (± 5°C) por 5 minutos.
2. Submeter a choque térmico, transferindo os tubos imediatamente para uma caixa de isopor com gelo.
3. Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm, para separar a amostra da sílica.
4. Aplicar a amostra na placa para amplificação.
Importante: o 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. Acondicionar a placa no termociclador PCR ou qPCR.
6. 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 15 s	Anelamento: 60°C por 60 s

Suporte Técnico

Para assistência técnica e maiores informações, favor entrar em contato o Suporte Técnico pelo e-mail newgene@simbios.com.br ou pelo telefone (51) 3074-7400.
Responsável Técnico: Luciane Dubina Pinto – CRMV-RS6694