



## 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.

**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
Mastermix RTPCRamp *	Tampão, dNTP's, DTT, água
Enzima RTTaq	Taq polimerase + MMLV
Água	Água purificada

\*Cada tubo de mastermix corresponde à 100 reações de 20µL.

#### 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 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.

#### Sugestão de preparo dos componentes para reação com volume final 20µL

Componente	Volume para:			Concentração final na reação
	1 reação	8 reações	24 reações	
Mastermix RRTRTPCRamp (2x)	10µL	80µL	240µL	1X
RTTaq	0,17µL	1,3µL	4,0µL	-
primer Forward	*conforme titulação	*conforme titulação	*conforme titulação	0,1 - 1,0µM
primer Reverse	*conforme titulação	*conforme titulação	*conforme titulação	0,1 - 1,0µM
sonda	*conforme titulação	*conforme titulação	*conforme titulação	0,1 - 0,5µM
Amostra	2µL	2µL	2µL	-
Água purificada	q.s.p 20µL	q.s.p 20µL	q.s.p 20µL	-

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

- Após a adição de todos os componentes vortexar e centrifugar por 30s a 10.000rpm.
- Em seguida alíquotar 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.

\* A sugestão de preparo é uma condição padrão para a amplificação de RNA, 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 .....		
40-45 ciclos:	Desnaturação: 95°C por 15 s	Anelamento: Conforme acerto dos primers/sonda

#### Suporte Técnico

Para assistência técnica e maiores informações, favor entrar em contato o Suporte Técnico pelo e-mail [newgene@simbios.com.br](mailto:newgene@simbios.com.br) ou pelo telefone (51) 3074-7400.