



MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit

Incluindo dNTPs, anchored oligo(dT)₂₀ primer, random hexamer primer e inibidor de RNases

ARMAZENAR A -20°C

Código: 13-10504-005 - 50 reações x 20µL

Descrição:

MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit é um sistema completo para síntese da primeira fita de moléculas de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA mensageiro (mRNA) ou RNA total. Este sistema foi otimizado para a amplificação de cDNA de até aproximadamente 13 kb.

A enzima *Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus* é uma versão modificada da enzima M-MLV apresentando mutações de ponto que reduzem a atividade de RNase H e aumentam a estabilidade térmica.

Devido à reduzida atividade de RNase H, não ocorre a degradação de moléculas de RNA durante a etapa de síntese da primeira fita de cDNA, resultando na síntese de uma grande quantidade de moléculas "full-length" de cDNA.

Devido à elevada estabilidade térmica, a enzima *Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus* pode ser utilizada na síntese de moléculas de cDNA em elevadas temperaturas (42 a 60°C), proporcionando um maior rendimento de moléculas de cDNA.

Dependendo da aplicação do cDNA, o usuário poderá escolher entre 2 tipos de primers:

Anchored oligo(dT)₂₀ Primer é uma mistura de 12 primers, cada primer consistindo de uma sequência de 20 bases T seguidos por 2 bases adicionais representadas por VN, aonde V é dA, dC ou dG e N é dA, dC, dG ou dT. A "âncora" VN permite a hibridização dos primers somente na extremidade 3' da cauda de poli-A de mRNA, promovendo uma síntese mais eficiente de moléculas "full-length" de cDNA.

É o método de escolha para geração de cDNA para experimentos de análise da expressão gênica por RT-qPCR devido a consistência dos resultados.

Random Hexamer Primer é uma mistura de primers de sequência randômica consistindo de uma sequência de 6 bases N, aonde N é dA, dC, dG ou dT. Devido a hibridização deste primer em várias sequências ao longo da molécula de RNA, teremos uma representação uniforme de todas as moléculas de RNA.

São utilizados na geração de cDNA a partir de RNAs que não possuem cauda poli-A.

Desta forma, a síntese do cDNA pode ser realizada a partir de mRNA poli-A⁺ ou RNA total.

Na próxima etapa, a reação de PCR é realizada utilizando primers específicos para os genes de interesse.

Neste caso, recomendamos o uso dos seguintes produtos: Taq DNA Polimerase, Hot Start Taq DNA Polimerase, SYBR Green qPCR Master Mix, EvaGreen qPCR Master Mix ou PROBE qPCR Master Mix. A LGC tem em estoque todos estes produtos.

Componentes do Kit para 50 reações

| Volume | Descrição | 50 reações (20µL) |
|---------|---|--------------------|
| 50 µL | Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus 200 unidades / µL | TAMPA VERMELHA |
| 50 µL | Inibidor de RNases 20 unidades / µL | TAMPA AZUL |
| 200 µL | 5X Tampão de Reação First-Strand cDNA | TAMPA TRANSPARENTE |
| 100 µL | 10mM dNTP Mix | TAMPA BRANCA |
| 50 µL | Anchored oligo(dT) ₂₀ Primer 50 µM | TAMPA AMARELA |
| 50 µL | Random Hexamer Primer 50 µM | TAMPA VERDE |
| 1000 µL | Água RNase-free | TAMPA TRANSPARENTE |

Nota Importante

Evite a contaminação por ribonucleases

A pureza e integridade do RNA é essencial para a síntese de moléculas "full-length" de cDNA. Como forma de prevenção para evitar a contaminação por ribonucleases, recomendamos o uso de materiais plásticos como microtubos e ponteiras com certificação RNase-free. Uso de água para biologia molecular com alto grau de pureza

LGC Biotecnologia Ltda.

Rua Pasadena, 235 – Parque Industrial San José
Cotia – CEP: 06715 864 / Fone-Fax: 11 4614 8070

livre de RNases. Uso de luvas durante a manipulação das amostras pois a pele humana é uma fonte de RNases. Uso do inibidor de RNases incluso no kit para proteger o RNA da atividade de RNases.

Instruções para Uso

1. Descongelar, misturar e centrifugar rapidamente todos os componentes antes do uso. Manter os reagentes no gelo.

2. Adicionar os seguintes reagentes em um microtubo RNase-free mantido no gelo:

| Componentes | Quantidade |
|---|-------------------------------|
| 1 pg a 5 µg de RNA total 1 pg a 0,5 µg de mRNA poli-A+ | x µL |
| Anchored oligo(dT) ₂₀ Primer ou Random Hexamer Primer ou 2 µM Primer gene-específico | 1 µL |
| Água RNase-free | Completar o volume para 10 µL |

3. Incubar os microtubos a 65°C durante 5 minutos.

4. Manter os microtubos no gelo por, pelo menos, 1 minuto.

5. Preparar a seguinte mistura de síntese de cDNA, adicionando os componentes na seguinte ordem:

| Componentes | 1 reação | 10 reações |
|---|----------|------------|
| 5X Tampão de Reação First-Strand cDNA | 4 µL | 40 µL |
| 10mM dNTP Mix | 2 µL | 20 µL |
| Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus 200 unidades / µL | 1 µL | 10 µL |
| Inibidor de RNases 20 unidades / µL | 1 µL | 10 µL |
| Água RNase-free | 2 µL | 20 µL |
| VOLUME | 10 µL | 100 µL |

6. Adicionar 10 µL da mistura de síntese de cDNA em cada microtubo contendo o RNA alvo e primer.

Volume total da reação de síntese de cDNA: 20 µL

7. Misturar a solução dos microtubos através de procedimento de pipetagem.

8. Incubar os microtubos de acordo com o primer utilizado para síntese do cDNA:

| | |
|---|--|
| Anchored oligo(dT) ₂₀ Primer | 60 minutos a 50°C* |
| Primer gene-específico | 60 minutos a 50°C |
| Random Hexamer Primer | 10 minutos a 25°C seguido por 60 minutos a 50°C |

* Para alvos de mRNA com alto conteúdo de bases GC, recomendamos a realização da reação de transcrição reversa incubando os microtubos durante 60 minutos a 55°C ou 60°C.

9. Incubar os microtubos por 5 minutos a 85°C para inativar a reação.

10. Manter os microtubos no gelo.

A mistura de síntese de cDNA pode ser armazenada a -20°C ou utilizada imediatamente em reações de PCR e PCR em Tempo Real.

Para reações de PCR, utilizar 1 a 5 µL da mistura de síntese de cDNA como alvo.

Controle de Qualidade

Cada lote deste produto é avaliado em reações de PCR e qPCR em tempo real em um termociclador ABI 7500 Real-Time PCR System seguindo o protocolo descrito a seguir utilizando 5 µL do cDNA sintetizado pelo **MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit** a partir de 1 µg de RNA total purificado por Trizo:



Reação de Amplificação por PCR

Protocolo realizado seguindo o manual do produto Taq DNA Polimerase utilizando os seguintes componentes da reação de PCR:

| Componente da Reação de PCR | Volume | Concentração Final |
|--|--------------|--------------------|
| Água para Biologia Molecular | 33,75 µL | |
| 10X Tampão de Reação 15 mM de MgCl ₂ | 5 µL | 1X |
| 10 mM dNTP Mix | 1 µL | 0,2 mM |
| 10 µM Primer Forward GAPDH 5' CAAGGTCATCCATGACAACCTG 3' | 2,5 µL | 0,5 µM |
| 10 µM Primer Reverse GAPDH 5' GTCCACCACCTGTTGCTGTAG 3' | 2,5 µL | 0,5 µM |
| Taq DNA Polimerase 5U/µL | 0,25 µL | 1,25 U |
| cDNA | 5µL | |
| Volume Total | 50 µL | |

A reação de PCR foi realizada conforme as seguintes condições de ciclagem térmica:

| | Temp | Tempo | Ciclos |
|---------------------|------|-------------|-----------|
| Denaturação Inicial | 95°C | 3 minutos | 35 ciclos |
| Desnaturação | 95°C | 30 segundos | |
| Pareamento | 58°C | 30 segundos | |
| Extensão | 72°C | 45 segundos | |
| Extensão Final | 72°C | 10 minutos | |

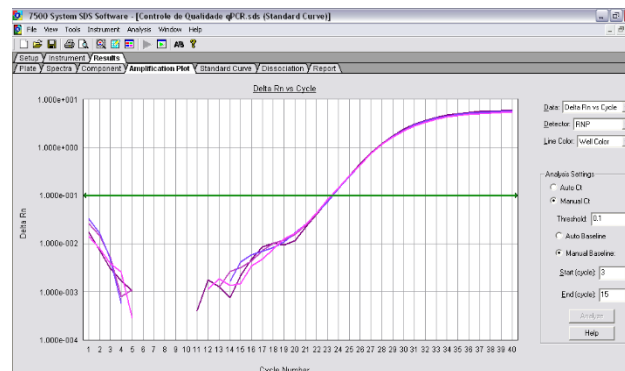
A análise da reação de PCR em um gel de agarose 2% deverá demonstrar a presença de uma forte banda correspondente a um produto de PCR de 496 pares de bases do gene GAPDH humano.

PCR Quantitativo em Tempo Real

Protocolo realizado seguindo o manual do produto PROBE qPCR Master Mix utilizando os seguintes componentes da reação de qPCR:

| Componentes | Volume | Concentração Final |
|---|--------------|--------------------|
| 2X Tampão de Reação qPCR LOW ROX | 12,5 µL | 1X |
| 20 µM Primer Direto RNase P 5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G - 3' | 0,5 µL | 400 nM |
| 20 µM Primer Reverso RNase P 5' - GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT - 3' | 0,5 µL | 400 nM |
| Sonda Fluorescente RNase P 3- FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ-1 - 3' | 0,5 µL | 200 nM |
| Hot Start Taq DNA Polimerase | 0,5 µL | |
| Água RNase-free | 3,5 µL | |
| cDNA | 5 µL | |
| Volume Total | 25 µL | |

A análise dos testes de qPCR em quadruplicata deverá demonstrar a detecção do gene RNase P humano com Ct (cycle threshold) entre os ciclos 23 a 24 e desvio padrão de Ct < 0.2.



MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit Revisão 3

Produto exclusivo para pesquisas científicas