

MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit
Incluindo dNTPs, Anchored oligo (dT)₂₀ primer,
Random Hexamer primer e inibidor de RNases
Código: 13-10504-005 - 50 reações x 20µL

Instruções de Uso

Produto exclusivo para pesquisas científicas.

1. 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
200 µL	5X Tampão de Reação First-Strand cDNA	TAMPA TRANSPARENTE
100 µL	10mM dNTP Mix	TAMPA TRANSPARENTE
50 µL	Anchored oligo(dT) ₂₀ Primer 50 µM	TAMPA TRANSPARENTE
50 µL	Random Hexamer Primer 50 µM	TAMPA TRANSPARENTE
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 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.

2. Modo de 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

. 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
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 Prime	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.

3. Armazenamento

Armazenar em -20°C

4. 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:

5. 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' CAAGGTCATCCATGACAACCTTG 3'	2,5 µL	0,5 µM
10 µM Primer Reverse GAPDH 5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 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
Desnaturação Inicial	95°C	3 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	35 ciclos
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.

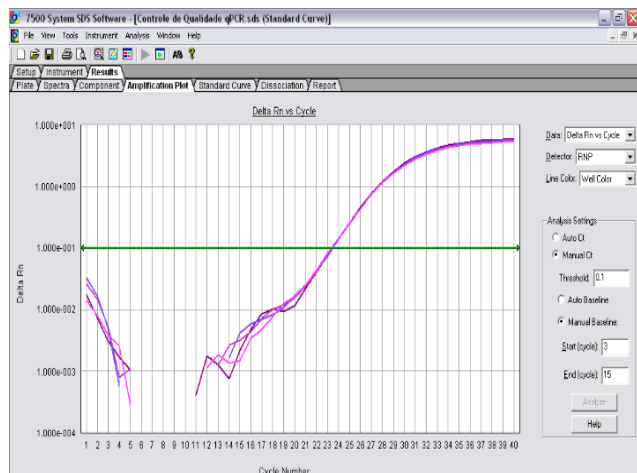
PCR Quantitativo em Tempo Real

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

6. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **MMLV RNase** por ela fornecida contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

7. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA- CRBM 20.951/1

8. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br