**MMLV RNAse H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit**
**13-10504-005 – 50 reações**
**Ficha de Instruções de Uso**

## 1.Descrição

*MMLV RNAse H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)* 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 MMLV 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 "ancora" 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 Nova Biotecnologia 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 u/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 |

**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<br>1 pg a 0,5 µg de mRNA poli-A+ | x µL |
| *Anchored* oligo (dT)$_{20}$ Primer ou<br>*Random Hexamer Primer* ou<br>2 µM *Primer* gene-específico | 1 µL |
| Água RNAse-free | Completar o volume para 10 µL |

3 . Incubar os micro-tubos a 65°C durante 5 minutos.

4. Manter os microtubos no gelo por, durante 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* 200U/µL | 1 µL | 10 µL |
| Água RNAse-free | 3 µL | 30 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 em -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 Bioer 960, 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.

**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*<br>5' CAAGGTCATCCATGACAACTTG 3' | 2,5 µL | 0,5 µM |
| 10 µM *Primer Reverse GAPDH*<br>5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3' | 2,5 µL | 0,5 µM |
| Taq DNA Polimerase 5U/µL | 0,25 µL | 1,25 U |
| cDNA | 5uL | |
| **Volume Total** | **50 uL** | |

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 | |

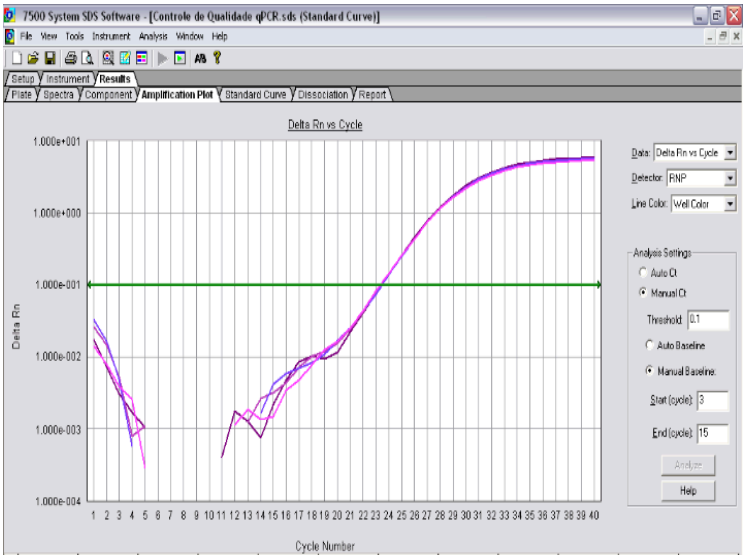
A análise da reação de PCR em um gel de agarose 2% deverá demonstrar a presença de uma forte banda correspondente a um produto de PCR de 496 pares de bases do gene *GAPDH* humano.

**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 Forward* RNase P<br>5' - AGA TTT GGA CCT GCG AGC G - 3' | 0,5 µL | 400 nM |
| 20 µM *Primer Reverse* RNase P<br>5' - GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT - 3' | 0,5 µL | 400 nM |
| Sonda Fluorescente RNase P<br>5' - 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 quadrupicata 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 H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit*** por ela fornecido 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: 06715-864 - COTIA/SP - BRASIL
CNPJ: 24.096.423/0001-15

**RESPONSÁVEL TÉCNICO**
Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20951

**8. Atendimento ao Consumidor**

Tel. +55 (11) 4243-2356
www.novabiotecnologia.com.br
e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br  sac@novabiotecnologia.com.br