

Transcriptase Reversa MMLV RNase H Minus**13-10508-005 - 10.000 U - 200 U/μL****Ficha de Instruções de Uso****1. Uso pretendido**

Transcriptase Reversa MMLV RNase H Minus é uma enzima para síntese da primeira fita de moléculas de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA de simples fita, DNA ou híbrido RNA:DNA. Esta transcriptase reversa é capaz de realizar a amplificação de moléculas 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 a 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 a aumentada 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.

2. Descrição do Produto

Código N°	13-10508-005	10.000U
50 μL	Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus 200 unidades/μL	TAMPA VERMELHA
500 μL	5X Tampão de Reação First- Strand cDNA	TAMPA TRANSPARENTE

Observação 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 RNase incluso no kit para proteger o RNA da atividade de RNases

3. Armazenamento

-20°C

4. Validade

24 meses a partir da data de fabricação

5. Informação de Segurança

- 5.1 Deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
 - 5.2 Todo pessoal envolvido na execução do ensaio deve utilizar equipamentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
 - 5.3 O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.
 - 5.4 Após o recebimento do produto, verificar se a embalagem está danificada ou se há vazamento dos líquidos. Proteger-se adequadamente e caso seja necessário realizar a reclamação ao SAC.
 - 5.5 Não utilizar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
 - 5.6 Não utilizar o produto após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
 - 5.7 Armazenar os componentes e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
 - 5.8 Para minimizar risco de contaminações é recomendado trabalhar em cabine de fluxo laminar.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a **NOVA BIOTECNOLOGIA**.

6. Procedimento

- Descongelar, misturar e centrifugar rapidamente todos os componentes antes do uso.
- Manter os reagentes no gelo.
- 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.
- Manter os microtubos no gelo por, pelo menos, 1 minuto.
- 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
Inibidor de RNase 40 unidades / µL (<i>opcional</i>)	1 µL	10 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

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

- Incubar os microtubos por 5 minutos a 85°C para inativar a reação.
- 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 a partir de 1 µg de RNA total purificado por RNeasy RT:

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 GAPDH5' CAAGTCATCCATGACAACCTTG 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	5uL	
Volume Total	50uL	

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

	Temp	Tempo	Ciclos
Denaturação 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

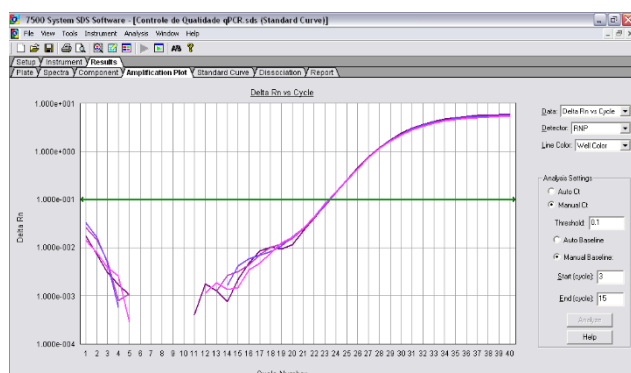
Protocolo realizado seguindo o manual do produto

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.



7. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **MMLV RNase H Minus** 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.

8. 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

9. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotechologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotechologia.com.br sac@novabiotechologia.com.br