



cDNAsa[®]

cDNAsa[®] Transcriptasa Reversa del Retrovirus del Virus de la Leucemia Murina (MLV).

Para Uso Exclusivo en Laboratorios de Investigación

RT-50K cDNAsa[®] - 50,000 Unidades (200U/μl) 250 μl Transcriptasa Reversa MLV.

Descripción

La **cDNAsa[®]** es una DNA polimerasa dependiente de RNA (**Transcriptasa Reversa**) recombinante que es producto del gen Pol del retrovirus de la leucemia murina (Moloney Murine Leukemia Virus: M-MLV).

La **cDNAsa[®]** sintetiza una cadena de DNA complementaria (cDNA) mediada por un primer específico, a partir de moléculas RNA de una sola cadena.

La **cDNAsa[®]** es una enzima recombinante producida en E- coli y purificada en columnas de afinidad. Esta enzima fue modificada eliminando el centro activo de RNasa H lo que suprime su actividad y reduce la degradación del RNA en la transcripción inversa, aumentando el rendimiento de la síntesis y longitud del cDNA.

Actividad de la Enzima

Cada lote de cDNAsa[®] es evaluado a través de ensayos de transcripción reversa y amplificación por PCR comparándola con un estándar comercial, asegurando que la actividad en todos los lotes producidos sea la misma (200U/μl).

Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima requerida para incorporar 1 nmol de [³²P]dATP en forma insoluble en 10 minutos a 37°C usando RNA poli-A como molde y oligo dT como iniciador.

Pureza.

La pureza de cada preparación de cDNAsa[®] es evaluada mediante electroforesis en geles al 10% de poliacrilamida-SDS, la que se observa como una banda de 70 kD. La enzima es libre de RNAsas y DNAsas.

Características y aplicaciones

La **cDNAsa[®]** puede emplearse en una amplia gama de aplicaciones de transcripción reversa y amplificación de segmentos de RNA: evaluación de niveles de expresión genética, microRNAs, amplificación y clonación de genes, transcripción reversa y PCR en punto final y en tiempo real; etc.

El kit incluye un buffer (**Buffer RT 5X**) para llevar a cabo ensayos de transcripción reversa en dos pasos.

La **cDNAsa[®]** se inactiva calentándola a 70°C por 10 minutos.

Componentes:

1 vial: **cDNAsa[®]** - 50,000 Unidades (200U/μl) 250 μl.

1 vial: Buffer RT 5X - 500 μl (Tris-HCl pH 8.3 250mM, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM, DTT 50mM).

1 vial: H₂O DEPC 500 μl.

Almacenar a -20°C. La vida media de la enzima a esta temperatura es de 4 años.

ATENCIÓN: Centrifugue brevemente el contenido de los tubos antes de usar.

SÍNTESIS DE cDNA

1.- En un microtubo de PCR adicionar los siguientes reactivos en hielo:

REACTIVO	INGREDIENTE	FINAL
RNA	1 a 5 µg de RNA total o 1 ng a 500 ng de RNAm	5 µl /rx
**Primer especifico	50 pmol/µl (50 µM).	100 pmol/rx
Agua DEPC		cbp 11µl

** Cuando el RNA es cadena positiva emplear un primer reverso. Para un RNA de polaridad negativa utilizar el primer delantero (forward). Si emplea oligo dT usar 500ng; en el caso de random primers usar 750 ng.

2.- En termociclador incubar 70°C/5 min, 4°C/5min.

3.- Adicionar a la mezcla anterior:

REACTIVO	STOCK	FINAL
Buffer RT	5X	1X
dNTPs mix*	10 mM	1µM
Inhibidor de RNAsas*	40 U/µl	20 U/rx
cDNAsa	200 U/µl	200 U/rx
Agua DEPC		cbp 9 µl

*No incluidos

4.- En un termociclador incubar a **50°C /60 min, 70°C /10 min, 4°C /5min.**

El producto de la reacción (cDNA) queda listo para ser utilizado en reacciones de PCR.

NOTA: Mantener todos los ingredientes en hielo y manejar consumibles libres de RNAsas.

Referencias

Kotewicz ML, Sampson CM, D'Alessio JM, Gerard GF. 1988 Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity Nucleic Acids Research, 16(1):265- 277.