

ECRA TRANSCRIPTASE REVERSA

Kit enzimático para síntese de cDNA

Quantidade 10.000 U; Código do produto: EB2-19



Validade de 12 meses após a abertura.
Temperatura de transporte: -20 °C a 10 °C.
Temperatura de armazenamento: -20 °C.

Descrição do produto

A **ECRA TRANSCRIPTASE REVERSA** é uma transcriptase do tipo FeLV-RT que é mais precisa do que as enzimas do tipo MMLV-RT comercialmente encontradas. Além disso, esta enzima foi molecularmente arquitetada com mutações que melhoram características como estabilidade térmica, precisão e rapidez, tudo com uma atividade de RNase H reduzida. A enzima é produzida em *E. coli* através do gene *pol* recombinante modificado do Vírus da Leucemia Felina [1] e pode ser usada para sintetizar fitas de cDNA a temperaturas de até 55 °C, fornecendo maior especificidade, maiores rendimentos de cDNA e mais produtos de amplificação completos em relação a outras transcriptases. **ECRA TRANSCRIPTASE REVERSA** pode gerar cDNAs de 0,1 até 12 kb.

Diretrizes para o uso da ECRA TRANSCRIPTASE REVERSA

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (µL)	Cor
ECRA TR	50	Vermelho
Tampão TR 5X	1000	Azul
Oligo(dT) ₂₀	50	Verde
Hexâmeros randômicos	50	Amarelo
DTT 100 mM	500	Roxo
H ₂ O	1250	Cinza

Diretrizes para a síntese de cDNA

Descongele todos os componentes necessários para a reação, com exceção da enzima, que deve ser mantida em gelo e de preferência ser retirada do estoque apenas no momento de sua utilização. O seguinte volume de reação de 20 µL deve ser usado para 10 pg a 5 µg de RNA total ou 0,01 a 500 ng de mRNA.

1. Adicione os seguintes componentes a um tubo de microcentrífuga livre de nucleases:
 - a. 1 µL de Oligo(dT)₂₀ (50 µM); ou 50 a

- 250 ng de hexâmeros randômicos (50 ng/µL); ou 2 pmol de primer específico;
 - b. 1 ng a 7 µg de RNA total ou 100 pg a 500 ng mRNA (preferencialmente tratado com DNase);
 - c. 1 µL dNTP mix (10 mM e pH neutro);
 - d. Complete com H₂O até 13 µL.
2. Aqueça a mistura a 65 °C por 5 min e incube no gelo por pelo menos 1 min.
 3. Após rápida centrifugação, adicionar:
 - a. 4 µL de tampão TR 5X;
 - b. 1 µL de DTT 100 mM;
 - c. 1 µL de inibidor de RNase ou H₂O (opcional);
 - d. 1 µL de **ECRA TR** (200 U/µL)*

* Recomenda-se utilizar 2 µL (400 U) de **ECRA TR** em caso de síntese de cDNA acima de 5 kb a temperaturas acima de 50 °C usando um primer específico ou Oligo(dT)₂₀.

4. Se usar hexâmeros randômicos, incube o tubo a 25 °C por 5 min.
5. Incubar a 50 °C por 30 a 60 min. Aumente a temperatura de reação para 55 °C para primers específicos. A temperatura de reação também pode ser aumentada para 55 °C para moldes de difícil amplificação.
6. Inative a reação aquecendo-a a 70 °C por 15 min.

Reação de PCR

O cDNA agora pode ser usado como molde de amplificação em PCR. Recomenda-se utilizar 2 µl da reação de síntese de cDNA e diluições seriadas. No entanto, a ampliação pode exigir a remoção do RNA complementar ao cDNA (aquelas >1 kb). Para remover o RNA complementar ao cDNA, adicione RNase H (produto não fornecido).

Resolução de problemas

O RNA é extremamente sensível à degradação pelas RNases presentes no ambiente. Tome cuidado para proteger o RNA da degradação, mantenha a bancada limpa com solução descontaminante, use luvas, use tubos estéreis e ponteiros de micropipetas com filtro.

Verifique a integridade do RNA antes da síntese de cDNA no gel de agarose desnaturante ou método equivalente. Inclua controle positivo em paralelo. Descongele e mantenha os reagentes no gelo e misture bem antes de usar os componentes. Para obter melhores resultados, a técnica e a quantidade do primer, RNA molde, tempo de incubação e temperatura usadas devem ser otimizadas. A transcrição de alguns RNAs ricos em GC pode ser aprimorada pela adição de betaína 1 M (final) ou DMSO a 5% (final) (produtos não fornecidos).

Especificações

Definição unitária

Uma unidade incorpora 1 nmol de dTTP em material genético em 10 min a 37 °C usando poli(A) Oligo(dT)₂₀ como primer modelo [2].

Tampão de reação (Tampão TR 5X): Tris-HCl 250 mM; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM; BSA 0,5% (p/v); pH 8,3.

Tampão de armazenamento: Tris-HCl 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; NP-40 0,01% (v/v); Glicerol 50% (v/v); pH 7,5.

H₂O: a água fornecida pela *ECRA Biotec* é tratada para eliminação de nucleases.

Armazenamento e uso

Armazene todos os componentes a -20 °C. Descongele o tampão de reação e o DTT 100 mM em temperatura ambiente e armazene imediatamente após o uso.

Controle de Qualidade

Este produto passou pelos seguintes ensaios de controle de qualidade: análise de pureza em gel SDS-PAGE; ausência e atividades de ribonuclease; rendimento e comprimento do produto cDNA.

Referências

- [1] D.J. Operario, H.M. Reynolds, B. Kim, Comparison of DNA polymerase activities between recombinant feline immunodeficiency and leukemia virus reverse transcriptases, *Virology*. (2005).
- [2] K. Yasukawa, M. Mizuno, A. Konishi, K. Inouye, Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis, *J. Biotechnol.* 150 (2010) 299–306.

Garantia

A *ECRA Biotec* garante que seus produtos atendem às especificações indicadas na seção de dados técnicos. Substituiremos os produtos gratuitamente se não estiverem conforme as especificações. Esta substituição deve ser feita dentro do prazo de 60 dias após o recebimento. Em consideração aos compromissos acima referidos pela *ECRA Biotec*, o comprador concorda e aceita as seguintes condições:

- Que esta garantia substitui todas as outras garantias, expressas ou implícitas;
- Que único recurso do comprador será para obter a substituição do produto de forma gratuita.

Uso para a pesquisa

Estes produtos se destinam a fins de pesquisa por pessoas qualificadas.

Aviso aos usuários

É de responsabilidade do usuário utilizar os produtos da *ECRA Biotec* para determinar por si próprio a adequação de qualquer material e/ou procedimento para uma finalidade específica e que adote as precauções de segurança que possam ser necessárias.

ECRA TRANSCRIPTASE REVERSA é uma marca comercial da *ECRA Biotec*.

Versão 1 (Fev/2021)

ECRA Biotec Serviços e Pesquisas LTDA.

Estr. Giuseppina Vianelli Di Napolli, 1455, Conj W8, Campinas - SP 13086-530
sac@ecrabiotec.com