

# **M-MLV *Transcripta***

---

Para síntesis de la primer cadena de ADNc



**PB-L**  
**Productos**  
**Bio-Lógicos®**

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

---

<http://www.pb-l.com.ar>



# M-MLV *Transcripta*

Cat. no. EA13

Contenido	EA1301 10000 U	EA1302 20000 U	EA1303 40000U
M-MLV <i>Transcripta</i> (200 U/μl)	50 μl	100 μl	200 μl
Buffer de reacción 5×	250 μl	500 μl	1000 μl
ddH <sub>2</sub> O (RNAsa free)	1000 μl	1000 μl	1000 μl
Protocolo	1	1	1

## Almacenamiento

M-MLV *Transcripta* puede ser almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 meses

## Aclaración

*Este producto ha sido desarrollado para su uso exclusivo en investigación.*

*No apto para uso in vitro en ensayos con animales o humanos.*

## Introducción

M-MLV *Transcripta* es una ADN polimerasa ARN dependiente de segunda generación, sin actividad RNAsaH, capaz de sintetizar ADNc a partir de moldes de ARN.

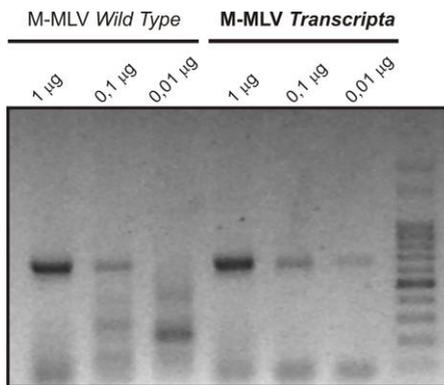
Esta enzima ha sido modificada genéticamente para aumentar la sensibilidad, especificidad y termoestabilidad respecto a su versión *wild type*. Estas dos últimas características hacen que sea posible la

síntesis de ADNc a partir de moléculas de ARN con estructuras secundarias complejas.

M-MLV *Transcripta* está recomendada para reacciones de rutina de retrotranscripción a partir de ARN total, mensajero o específico, RT-qPCR, también es apta para su uso en 5' RACE PCR, primer extension y construcción de bibliotecas de ADNc.

### Sensibilidad

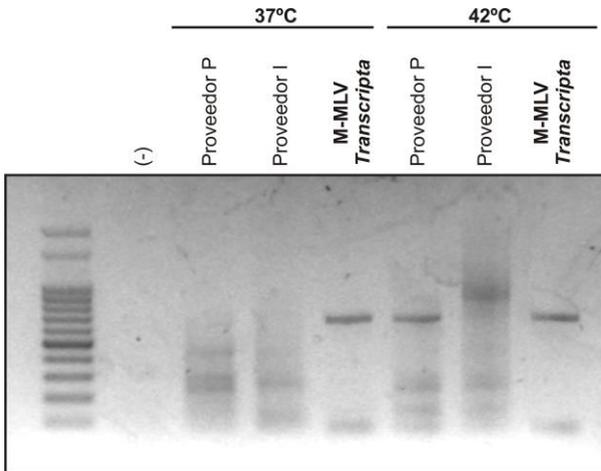
M-MLV *Transcripta* en comparación a su versión *wild type* posee una mayor sensibilidad, lo que permite la detección de moléculas blancas aún en muy bajas concentraciones.



PCR de ADNc obtenido a partir de 1, 0,1, 0,01 µg de ARN total de células eucariotas utilizando hexámeros a 37°C. Ladder 100 pb

## Especificidad

M-MLV *Transcripta* posee mayor especificidad para la detección de blancos aún a bajas temperaturas de reacción (ej. 37°C)



ADNc obtenido a partir de ARN total (0,2 µg) y *primers* al azar a 37°C y 42°C, seguido de una PCR con *primers* específicos

## Termoestabilidad

M-MLV *Transcripta* es activa en el rango de temperatura 37-65°C. Sin embargo es importante tener en cuenta que altas temperaturas (>55°C) el ARN sensible a la degradación como consecuencia de la presencia de iones Mg<sup>2+</sup> en el buffer de reacción. (Gerard,G.F., Collins,S. and Smith,M.D. 2002, *Biotechniques* 33).

## Definición de una unidad

Una unidad de M-MLV *Transcripta* se define como la cantidad de enzima necesaria para incorporar 1 nmol de deoxinucleótidos al material insoluble en TCA 10%, en 10 minutos a 37°C con un par molde: primer de polyA · poly (dT)<sub>12-18</sub>

## Controles de calidad

M-MLV *Transcripta* está certificada de ser libre de DNAsas (endo y exonucleasas) y RNAsas. Posee una pureza mayor al 95% comprobada por SDS-PAGE con tinción de *Comassie Blue*.

## Protocolo

### Síntesis de la primer cadena de ADNc

**Una reacción de 20 µl puede ser utilizada para retrotranscribir de 1 a 5 µg de ARN total o 50 a 500 ng de ARNm.**

1. Agregue los siguientes componentes a un tubo de reacción libre de nucleasas:
  - 2 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (10 µM), o 2 µl de hexámeros al azar (10 µM), o 2 pmol de un primer específico.
  - 1-5 µg de ARN total, o 50-500 ng de ARNm
  - 2 µl dNTPs
  - Agua libre de nucleasas, para completar un volumen de 15 µl.
2. Calentar a 70 °C durante 5 min (este paso permite la relajación de las estructuras secundarias del ARN), y luego coloque el tubo inmediatamente en hielo durante 2 min.

3. Centrifugar brevemente y luego añadir 4  $\mu\text{l}$  del buffer de reacción 5x.

**Opcional: Si la cantidad de molde inicial es menor a 50 ng, se recomienda añadir 0,5-1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsa (RNase inhibitor 20 U/ $\mu\text{l}$ ).**

4. Agregar 1  $\mu\text{l}$  (200U) de M-MLV *Transcripta* y mezclar suavemente. Si se utilizan hexámeros al azar se recomienda incubar la reacción a 25°C durante 10 min.
5. Incubar a 37°C cuando se utilizan hexámeros al azar o a 42 °C si son *primers* específicos (la temperatura óptima puede variar de 42 a 60°C según su protocolo) durante 60 min.

**Opcional: Si la muestra será incubada con una RNAsaH, se recomienda calentar la reacción a 95°C durante 5 minutos, para la inactivación de la retrotranscriptasa. Luego añadir 1  $\mu\text{l}$  de RNAsaH (2 U), incubar a 37°C durante 20 min y luego inactivar la RNAsaH incubando la muestra a 95°C por 5 minutos.**

6. Diluir la reacción a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  en ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas y utilizar 2-5  $\mu\text{l}$  para la posterior amplificación por PCR.

### **Amplificación por PCR**

Tomar de 2-5  $\mu\text{l}$  del producto de la síntesis de la primera cadena de ADNc para la reacción de PCR; el aumento de la cantidad de ADNc no siempre se traduce en un aumento del producto de PCR, pero si incrementa la concentración de inhibidores presentes en la reacción de síntesis de ADNc, disminuyendo la eficiencia de la

reacción de PCR.

1. Preparar una reacción de PCR estandar según la siguiente tabla:

Reactivos	Volumen
Buffer de PCR 10x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 µl
dNTP 2 mM	2,5 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl
Taq <i>Pegasus</i> (5 U/µl)	0.2 µl
cDNA	2-5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 25 µl

2. Programar el termociclador según el perfil de ciclado estandar:

Temperatura	Tiempo	
92°C	2 min	} 30-40 ciclos
92°C	15 seg.	
48-60°C	15 Seg.	
72°C	1 min/1000pb	
72°C	2-5 min	

**Nota:** Las condiciones de reacción y el perfil de ciclado deberán ser optimizados según cada par de *primers*:molde