



Kit síntesis de cDNA

Para síntesis de la primera cadena de cDNA



PB-L
Productos®
Bio-Lógicos

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

Kit síntesis de cDNA

Cat. no. KA01

Contenido	KA0101 50 reacciones	KA0102 100 reacciones
Retrotranscriptasa (200 U/μl)	50 μl	100 μl
Buffer de reacción 5×	250 μl	500 μl
Primer PoliT ₁₈ (25 μM)	80 μl	160 μl
Hexámeros N ₆ (100 μM)	100 μl	200 μl
dNTPs mix (10 mM)	50 μl	100 μl
<i>RNase Inhibitor</i> (40 U/μl)	15 μl	30 μl
d ₄ H ₂ O Libre de DNasas y RNasas	1 ml	1 ml
ARN Control positivo	50 μl	50 μl
Primers control positivo (5 μM)	100 μl	100 μl
Protocolo	1	1

Almacenamiento

El Kit síntesis de cDNA debe ser almacenado a -20 °C durante 24 meses. Una vez abierto el kit alicuotear el ARN del control positivo y conservar a -80 °C. **No usar más de 2 veces cada alícuota.**

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

El Kit síntesis de cDNA ha sido diseñado para la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de muestras de ARN total o ARNm, para luego ser utilizado directamente en reacciones de amplificación por PCR. El kit provee *primers* Oligo dT₁₈ para la retrotranscripción de ARNm, y de Hexámeros N₆ para la síntesis de cDNA a partir de ARN total. También puede ser utilizado con *primers* específicos; en ese caso el usuario deberá incluir en la reacción el primer correspondiente.

La reacción de síntesis de cDNA es llevada a cabo por una enzima retrotranscriptasa M-MLV modificada genéticamente para ser más termoestable y no presentar actividad RNasaH, lo que resulta en un aumento de la eficiencia de producción de cDNA. Además, se incluye un inhibidor de RNasas, para una mayor protección del molde de ARN, por posibles contaminaciones con RNasas. El kit incluye un ARN utilizado como control positivo junto con los primers correspondientes.

Recomendaciones

- Para la obtención de una buena eficiencia de síntesis de cDNA, se recomienda utilizar ARN de alta calidad e integridad.
- Durante los pasos de purificación de ARN es posible que exista la copurificación de trazas de ADN. Estas moléculas podrían ser amplificadas, en conjunto con el cDNA molde. Por este motivo se recomienda realizar una incubación con DNasaI (RNasa Free) previo a la síntesis de cDNA, si su protocolo arrastra trazas de ADNg.
- La utilización de *primers* Oligo dT₁₈ se utiliza para la síntesis de cDNA a partir de ARN con extremos 3' PolyA. Estas moléculas son una fracción minoritaria dentro del ARN total (1-2%), por lo tanto, la

cantidad y complejidad del producto obtenido es considerablemente menor en comparación a las reacciones con Hexámeros N₆.

- En el caso de la utilización de Hexámeros N₆, se recomienda utilizar 50 ng de Hexámeros N₆ por cada 5 µg de ARN. Aumentar la concentración de Hexámeros N₆ puede aumentar la eficiencia de la reacción, sin embargo, la misma estará enriquecida de moléculas de cDNA de menor tamaño (<500 pb). En este sentido, se recomienda optimizar la relación Hexámeros N₆: RNA para maximizar el tamaño de las moléculas de cDNA.

Protocolo para la Síntesis de la primera cadena de cDNA

1. Agregue los siguientes componentes a un tubo de reacción libre de nucleasas:

Mix 1

Reactivos	Muestra	Control* ³
	Volumen	Volumen
Oligo dT18 (25 µM) ó	1 µl (2,5 µM _f)	
Hexámeros N ₆ (100 µM)* ⁴	ó 1 µl (10 µM _f) * ¹	1 µl (10 µM _f)
dNTPs mix (10 mM)	1 µl (1 mM _f)	1 µl (1 mM _f)
Molde ARN	ARN total <5 µg * ²	1 µl (ARN control)
	ARN PolyA <1 µg	
ddH ₂ O RNasa Free	Hasta 10 µl	Hasta 10 µl

*1- La concentración de Hexámero N₆ puede optimizarse entre 5 -10 µM_f

*2- La cantidad de ARN total puede optimizarse de 1-10 µg

*3- La reacción del control positivo está diseñada para realizarse solamente con primers Hexámero N₆.

*4- Si utiliza primers específicos, debe optimizar la reacción utilizando 2,5-5 µM_f.

2. Homogenizar e incubar a 65 °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.

Nota: No incubar a temperaturas mayores a 65°C

3. Agregar los siguientes componentes a un tubo de reacción libre de nucleasas:

Mix 2

Reactivos	1 tubo de reacción*1
	Volumen
Buffer de reacción (5X)	4 µl (2Xf)
<i>RNase inhibitor</i> (40 U/ul)	0,25 µl (10 U _f)
M-MLV (200 U/µl)	1 µl (200 U _f)
_{dd} H ₂ O RNasa Free	hasta 10 µl

*1- Calcular el volumen de Mix 2 dependiendo de la cantidad de tubos de reacción a utilizar incluyendo uno para el control positivo.

4. Juntar 10 µl de Mix 1 y 10 µl de Mix 2 en un tubo de reacción, homogenizar e incubar la reacción a 42 °C durante 60 minutos.

Nota: si la reacción utiliza hexámeros N₆, realizar una preincubación de 5 minutos a 25 °C y luego incubar la reacción a 42 °C durante 60 minutos.

5. La enzima puede ser inactivada incubando la reacción 15 minutos a 70 °C.

La reacción puede ser almacenada a -20 °C o utilizada en amplificaciones por PCR inmediatamente.

Opcional: si utiliza RNasaH, se recomienda calentar la reacción a 95 °C durante 5 minutos, para la inactivación de la retrotranscriptasa. Luego añadir 1 µl de RNasaH (2 U), incubar a 37 °C durante 20 min y luego inactivar la RNasaH.

Amplificación por PCR

Tomar 2-5 μl * del producto de la síntesis de la primera cadena de cDNA para la reacción de PCR; el aumento de la cantidad de cDNA no siempre se traduce en un aumento del producto de PCR, pero sí incrementa la concentración de inhibidores presentes en la reacción de síntesis de ADNc, disminuyendo la eficiencia de la reacción de PCR.

**Se recomienda incorporar a la reacción un volumen no mayor al 10% del volumen final de reacción de amplificación (ej.: incorporar 2 μl de cDNA en 20 μl de PCR o qPCR).*

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

Reactivos	Muestra	Control positivo
	Volumen	Volumen
Buffer PCR (10x)	2 μl	2 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl	0,6 μl
dNTPs (2 mM)	2 μl	2 μl
Primer 1 (10 μM)	0,5-1 μl	2 μl (mix primer control)* ¹
Primer 2 (10 μM)	0,5-1 μl	
Taq <i>Pegasus</i> (5 U/ μl)	0,2 μl	0,2 μl
cDNA	2-5 μl	2 μl
ddH ₂ O	Hasta 20 μl	Hasta 20 μl

*1- Los primers para el control positivo ya están mezclados (5 μM) y deben usarse a una concentración final de 0,5 μM final.

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

Temperatura	Tiempo
92 °C	2 min
92 °C	15 seg
48-60 °C	15 seg
72 °C	1 min/1000pb
72 °C	2-5 min

} 30-40 ciclos

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

El control positivo debe amplificar una banda de 1500 pb. El ciclado para el mismo puede ser en este rango de parámetros.

Temperatura	Tiempo
92-94 °C	2 -5 min
92-94 °C	15-30 seg
50-60 °C	15-30 seg
72 °C	100 – 180 seg
72 °C	2-5 min

} 35-40 ciclos

