

M-MLV *Transcripta* 2.0

Para síntesis de la primera cadena de ADNc



**PB-L
Productos
Bio-Lógicos®**

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

www.pb-l.com.ar

M-MLV *Transcripta* 2.0

Cat. N.º EA27

Contenido	EA2701 10.000 U	EA2702 20.000 U	EA2703 40.000 U
M-MLV <i>Transcripta</i> 2.0 (200 U/μl)	50 μl	100 μl	200 μl
Buffer M-MLV 5× (sin DTT)	250 μl	500 μl	1 ml
DTT 100 mM	125 μl	250 μl	2x 250 μl
Agua ultrapura – Libre de nucleasas	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Protocolo	1	1	1



Importante: el Buffer M-MLV 5x tiene una nueva formulación sin DTT. El mismo se envía como DTT 100 mM en un vial separado para asegurar su estabilidad en el tiempo.

Por favor, lea atentamente este manual antes de utilizar el kit para asegurar un uso correcto y obtener resultados óptimos.

Almacenamiento

Almacenar a -20 °C durante 24 meses.

Nota

*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* 2.0 es una ADN polimerasa ARN dependiente de segunda generación, sin actividad RNasa H, 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 generando moléculas de mayor tamaño.

Este producto se obtiene mediante un innovador proceso de purificación, lo que nos permite ofrecer una calidad superior en comparación con versiones anteriores. Además, se ha desarrollado una nueva formulación para esta enzima, otorgándole mayor eficiencia y estabilidad. M-MLV *Transcripta* 2.0 está recomendada para reacciones de rutina de retrotranscripción a partir de ARN total o mensajero, RT-qPCR, también es apta para su uso en 5' RACE PCR, *primer extension* y construcción de bibliotecas de ADNc.

Performance

En el siguiente gráfico se muestra la curva de amplificación obtenida con M-MLV *Transcripta* 2.0 (fucsia), comparada con la obtenida por un producto de características similares de otra marca internacional.

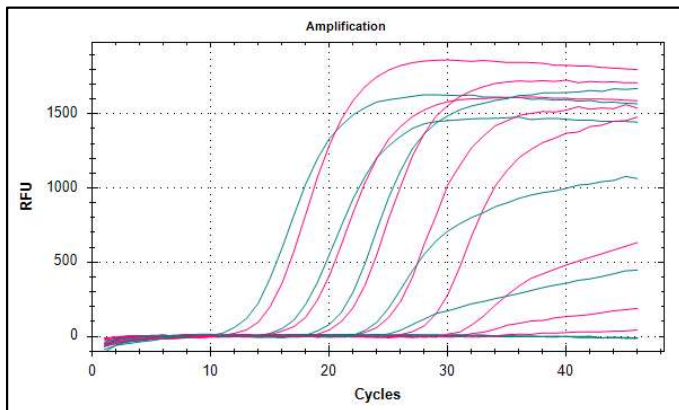
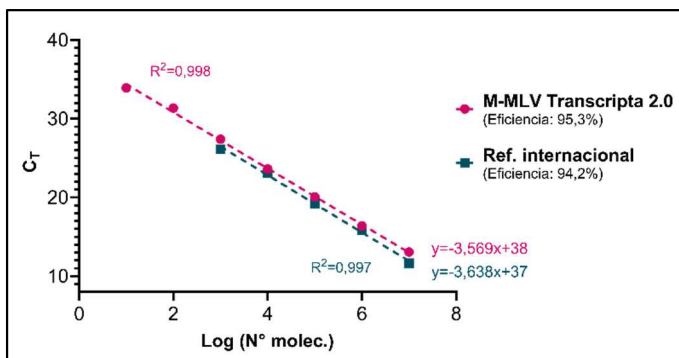


Fig. 1 PCR de ADNc obtenido a partir de 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 moléculas de ARN de un transcripto sintético de ASBVd. M-MLV *Transcripta* 2.0 (fucsia), M-MLV de proveedor internacional.

Eficiencia

Se determinó la eficiencia de cada reacción y el rango dinámico.



Log (N° molec.)	C _T	
	M-MLV <i>Transcripta 2.0</i>	Ref. internacional
7	13,05	11,62
6	16,38	15,81
5	20,06	19,23
4	23,61	23,13
3	27,39	26,15
2	31,37	N/A
1	33,92	N/A
NTC	N/A	N/A

Fig. 2 Eficiencia de qPCR. En fucsia se observa la curva de la M-MLV *Transcripta 2.0*, la cual evidenció un 95,3 % de eficiencia y un rango dinámico de hasta 10 moléculas; en verde azulado se observa la curva de M-MLV (proveedor internacional), cuya eficiencia es de 94,2 % y su rango dinámico llega hasta 1.000 moléculas.

Termoestabilidad

M-MLV *Transcripta 2.0* es activa en el rango de temperatura 37-65 °C. Sin embargo, es importante tener en cuenta que a altas temperaturas (>55 °C) el ARN es sensible a la degradación como consecuencia de la presencia de iones Mg²⁺ en el buffer de reacción (Gerard, G.F., Collins, S. and Smith, M.D.; 2002, *Biotechniques* 33).

Definición de unidad

Una unidad de M-MLV *Transcripta 2.0* 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)₁₂₋₁₈.

Controles de calidad

M-MLV *Transcripta 2.0* 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 *Coomassie Blue*.

Protocolo

Síntesis de la primera 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. Agregar los siguientes componentes a un tubo de reacción libre de nucleasas:
 - 2 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (10 µM), o 1 µl de hexámeros al azar (100 µM), o 4 µl de un primer específico (10 µM).
 - 1-5 µg de ARN total o 50-500 ng de ARNm.
 - 1 µl de dNTPs 10 mM (0,5 mM final).
 - Agua libre de nucleasas, para completar un volumen de 10 µl.
2. Calentar a 65 °C durante 5 min (este paso permite la relajación de las estructuras secundarias del ARN) y luego colocar el tubo inmediatamente en hielo durante 2 min.
3. Centrifugar brevemente y añadir 4 µl del Buffer M-MLV 5X (sin DTT).

Nota: si se utilizan hexámeros al azar, agregar además 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM) para una concentración final de 5 mM en el tubo de reacción (el buffer de retrotranscripción 5x aporta MgCl₂ hasta 3 mM final).

Opcional: si la cantidad de molde inicial es menor a 50 ng se recomienda añadir 0,5 - 1 µl de inhibidor de RNasas (*RNase Inhibitor* 40 U/µl, IC0101).

4. Agregar 2 µl de DTT 100 mM y homogenizar.

Recomendaciones importantes:

a. Conservar el DTT a -20 °C y cerrar el vial de forma inmediata después de su uso, para minimizar la exposición al aire y prevenir su oxidación.

b. Se recomienda alicuotar la solución de DTT 100 mM en volúmenes pequeños, a fin de evitar múltiples ciclos de congelado y descongelado que puedan afectar su estabilidad.

5. Agregar 1 µl (200 U) de M-MLV Transcripta 2.0 y mezclar suavemente.
Nota: si se utilizan hexámeros al azar, se recomienda incubar la reacción a 25 °C durante 10 min.
6. Completar con agua a un volumen final de 20 µl (incluyendo los 10 µl preparados para la relajación de las estructuras secundarias del ARN).
7. 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 55 °C según su protocolo) durante 30-50 min.

Opcional: si la muestra será incubada con RNasa H, se recomienda calentar la reacción a 95 °C durante 5 minutos para la inactivación de la retrotranscriptasa. Luego añadir 1 µl de RNasa H (2 U), incubar a 37 °C durante 20 min e inactivar la RNasa H incubando la muestra a 95 °C por 5 minutos.

Reactivos	Volumen
Primer <i>Reverse</i> (10 µM)	2 µl
ARN total o ARNm	x µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Agua ultrapura - Libre de nucleasas	c.s.p.
	10 µl
Buffer M-MLV 5x	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
M-MLV <i>Transcripta</i> 2.0 (200 U/ µl)	1 µl
Agua ultrapura - Libre de nucleasas	c.s.p.
	10 µl
Volumen total	20 µl

Amplificación por PCR

Tomar 2-5 μ 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 sí 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 estándar según la siguiente tabla:

Reactivos	Volumen
Buffer PCR (10X)	2 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ l
dNTPs (2 mM)	2 μ l
Primer <i>Forward</i> (10 μ M)	1 μ l
Primer <i>Reverse</i> (10 μ M)	1 μ l
Taq <i>Pegasus</i> (5 U/ μ l)	0,2 μ l
ADNc	2-5 μ l
Agua ultrapura - Libre de nucleasas	Hasta 20 μ l

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

Temperatura	Tiempo	} 30-40 ciclos
92 °C	2 min	
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.

