

MMLV Transcriptase Reversa (RNase H⁻)

Código: 100213

Frasco com 40.000 U (200 U/μL)

Descrição

A Transcriptase Reversa (RNase H⁻) recombinante do Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV RT), é uma DNA polimerase RNA-dependente que sintetiza a primeira cadeia de cDNA a partir de um molde de RNA cadeia simples ao qual um primer foi hibridizado. MMLV RT também estenderá primers hibridizados de DNA fita simples. A 50°C sua atividade permanece 100% e também pode manter a atividade maior que 80%, mesmo a 55°C. A enzima está em tampão de estoque composta da seguinte formulação: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT; 0,5% Triton-X-100 e 50% de Glicerol.

Componentes

- MMLV Transcriptase Reversa (200 U/μL) – 200 μL
- Tampão de reação 5X: 250 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM DTT; 15 mM MgCl₂; 375 mM KCl – 1mL (2).

Aplicações

Síntese da primeira fita de cDNA a partir de moléculas de RNA.

Armazenamento

Manter a - 20°C.

OBS: Para uso em biologia molecular.

Protocolo básico de reação

1. Adicione os seguintes reagentes a um tubo de PCR livre de RNase:
 - 1 μL oligo dT 12-18 (1 μg/μL) ou random primer (50-250 ng)
 - x μL RNA total (1-5 μg) ou mRNA (50-500 ng)
 - 1 μL dNTP (10 mM cada)
 - x μL H₂O tratada com DEPC (até um volume final de 10 μL)
2. Misture o conteúdo do tubo delicadamente e incube por 5 minutos a 70°C. Em seguida incube no gelo por 2-10 minutos.
3. Centrifugar por alguns segundos e colocar o tubo no gelo. Adicionar:
 - 4 μL de Tampão de reação 5X
 - 1 μL inibidor de RNase (40 U/μL)
 - 1 μL MMLV RT (200 U/μL)
 - 4 μL H₂O tratada com DEPC
4. Misture o conteúdo do tubo delicadamente. Incube por 10 minutos a 25°C e centrifugue por alguns segundos.
5. Incube a 37°C quando utilizar random primers ou a 42°C quando utilizar primers específicos, durante 1 hora (temperatura ótima pode variar de 42 a 60°C).
6. Opcional: Inative a enzima a 70°C por 10 minutos.
7. Utilizar 1- 2,5 μL para posterior amplificação por PCR.