

M-MLV Transcriptasa Reversa 5000U (200U/μl) Highway (K1600)

La M-MLV Transcriptasa Reversa *Highway* se emplea para sintetizar a partir de ARN o ADN de simple cadena y en la presencia de primers, una hebra de ADN complementaria. Esta enzima puede sintetizar ADNc de hasta 5 kpb.

USO EN INVESTIGACIÓN *IN VITRO*

PROTOCOLO

I. Síntesis de la primer hebra de DNAc empleando M-MLV Transcriptasa Reversa

Partir de una reacción de 20 μl totales conteniendo 1ng-5 μg de ARN total o 1-500 ng de ARNm.

1. Agregar los siguientes componentes en un tubo estéril en hielo:

ARN Templado	<ul style="list-style-type: none"> • ARNm(poli-A) o • ARN específico 	1 a 500 ng 1 a 5 μg
Primer	<ul style="list-style-type: none"> • Oligo (dT)15 primer (50μM) o • Hexámeros random primer (50 μM) 	1 μl 1 μl
Agua DEPC		c.s.p 13.4 μl
Volumen Total		13.4μl

2. Mezclar suavemente, dar un spin e incubar a 70°C por 5 min.

Luego enfriar en hielo, dar un spin y colocar nuevamente en hielo.

3. Agregar a la mezcla anterior los siguientes componentes en el orden indicado:

Buffer 5X First-Strand	4 μl
dNTPs (10mM c/u)	1 μl

Inhibidor RNAsaA (40U/ μ l)	0.6 μ l
M-MLV Transcriptasa Reversa	1 μ l
Volumen total de reacción	20 μ l

4. Mezclar suavemente y dar un spin

5. Para oligo (dT)15 incubar a 42°C por 60 min.

Para hexámeros random incubar a 37°C por 60 min.

6. Finalizar la reacción calentando a 70°C por 5 min.

El producto de la reacción de la Transcriptasa reversa, puede ser empleado inmediatamente en la síntesis de una segunda hebra de ADNc o conservar a -20°C por 1 semana.

Para períodos más largos, se recomienda conservar a -70°C.

II. Reacción de PCR

El producto de la reacción anterior puede ser empleado directamente en PCR o qPCR. El volumen no debería exceder 1/10 del volumen total de reacción.

Normalmente 2 μ l de la mezcla de reacción de la primer hebra de ADNc, se utilizan como templado para un volumen de reacción final de PCR de 50 μ l.