

### 1- Descrição

A **Transcriptase Reversa M-MLV** *pht* contém todos os componentes necessários para a conversão de RNA em cDNA de fita simples. Essa enzima foi modificada para possibilitar atividade RNase H reduzida e maior termoestabilidade. O produto gerado pode ser utilizado em análises de microarranjos de DNA, reações de PCR, qPCR, TaqMan-PCR, outras variações da técnica de PCR, estudos de expressão gênica e epidemiologia.

### 2- Apresentação

Composição	Código
RT Buffer (5X)	Z2.1
Transcriptase Reversa M-MLV (200 u/μL)	Z2
DTT 100 mM	R14

**Tipo de produto final:** cDNA

**Tipo de amostra:** RNA purificado

**Técnica:** Transcrição reversa de RNA com a produção de cDNA

### 3- Condições de armazenamento e transporte

- A **Transcriptase Reversa M-MLV** da *pht* pode ser transportada refrigerada em gelo gel ou em temperaturas inferiores. Manter ao abrigo da luz e umidade.

- A temperatura de armazenamento deve ser de -20 °C

### 4- Medida de segurança

Para informações sobre biossegurança e orientações em casos de acidentes com o produto, consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS), disponível por meio do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) da Phoneutria Biotecnologia e Serviços. O contato pode ser feito pelo e-mail [pht@phoneutria.com.br](mailto:pht@phoneutria.com.br) ou pelos telefones (31) 99585-3050 e (31) 3427-6413.

### 5- Protocolos de síntese

#### ITEM 6: (Protocolo de Síntese de cDNA sem desnaturação)

O protocolo do item 6 pode ser utilizado na maioria das reações, pois trata-se de um procedimento mais rápido e prático. Entretanto, quando o RNA alvo possui uma alta estruturação secundária e/ou alta concentração de C e G, a formação de cDNA pode ser dificultada.

**OBS:** NÃO É RECOMENDADA A UTILIZAÇÃO DESTE PROTOCOLO (Item 6) QUANDO UTILIZADO PRIMERS RANDÔMICOS OU OLIGO(dT). PARA ESSAS CONDIÇÕES, UTILIZE O PROTOCOLO DO ITEM 7.

**ITEM 7: (Protocolo de Síntese de cDNA com desnaturação)**

O protocolo do Item 7 pode ser utilizado para qualquer tipo de reação de síntese de cDNA, incluindo as que possuem RNA alvo com uma alta estruturação secundária e/ou alta concentração de C e G.

**6- Protocolo de Síntese de cDNA (sem desnaturação do RNA)**

1. Prepare uma reação com volume final de 20 µL adicionando os seguintes reagentes:

Reagente	Volume
RT Buffer (5X)	4 µL
Primer(s) reverso(s) (5 a 10 µM)	1 µL
DTT 100 mM	1 µL
dNTP 10 mM cada**	1 µL
Transcriptase Reversa M-MLV (200 u/µL)	1 µL
RNA molde*	1 a 10 µL
Água ultrapura**	Completar o volume para 20 µL

\*\*Os primers, dNTP, RNA molde e água ultrapura não são fornecidos neste kit.

2. Coloque o tubo ou placa no termociclador com o seguinte programa:

Etapa	Temperatura/Tempo
Transcrição reversa	50 °C por 30–60 min (quando utilizado primer reverso ao RNA alvo)
Inativação da RT	90 °C por 5 min
Aguardar a retirada do termociclador	4–15 °C ∞

3. O cDNA está pronto para ser utilizado ou estocado a -20 °C para uso futuro. Utilize entre 2,5 µL e 5 µL do cDNA produzido. O excesso de cDNA sem purificação pode inibir a reação da PCR.

**7- Protocolo de Síntese de cDNA (com desnaturação do RNA)**

1. Prepare uma reação com volume final de 13 µL adicionando os seguintes reagentes:

Reagente	Volume
RNA molde	1 a 10 µL
Primer(s) reverso(s) (5 a 10 µM) Ou Primers randômicos 100 µM Ou Oligo(dT) <sub>20</sub> 100 µM	1 µL
Água ultrapura	Completar o volume para 13 µL

2. A reação deve ser incubada (recomendamos o uso do termociclador) com o seguintes tempos e temperaturas:

80 °C	2 min
4 °C	3 min

3. **Adicione para cada reação os reagentes indicados abaixo.** O volume final de cada reação passará a ser de 20 µL.

Reagente	Volume
RT Buffer (5X)	4 µL
DTT 100 mM	1 µL
dNTP 10 mM cada	1 µL
Transcriptase Reversa M-MLV (200 u/µL)	1 µL

4. Coloque o tubo ou placa no termociclador com o seguinte programa:

Etapa	Temperatura/Tempo
Transcrição reversa	(Quando utilizado <b>primer reverso</b> ao RNA alvo) 50 °C por 30–60 min  ou  (Quando utilizado <b>primers randômicos ou Oligo-dT<sub>20</sub></b> ) 42 °C por 15–20 min 50 °C por 30–60 min
	Inativação da RT
Aguardar a retirada do termociclador	4–15 °C ∞

5. O cDNA está pronto para ser utilizado ou estocado a -20 °C para uso futuro. Utilize entre **2,5 µL e 5 µL do cDNA produzido.** O excesso de cDNA sem purificação pode inibir a reação da PCR.