

cDNA SYNTHESIS KIT

(c/ REMOVEDOR DE gDNA)

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-720

Armazenamento: a -18°C ou menos por dois anos

Descrição:

O cDNA SYNTHESIS KIT integra a tecnologia de um SuperMix de Transcrição Reversa de alta eficiência a um reagente otimizado para a remoção de DNA genômico (gDNA). O protocolo permite a eliminação de contaminantes de gDNA e a síntese de fitas complementares em uma etapa simplificada. Após a síntese do cDNA, a atividade enzimática e o removedor de gDNA são inativados simultaneamente via tratamento térmico a 85°C por 2 minutos.

Características:

- Protocolo Single-Tube: Realiza a digestão de gDNA e a síntese de cDNA de forma concomitante em um único tubo, otimizando o fluxo de trabalho (workflow) e reduzindo drasticamente o risco de contaminação cruzada.
- Flexibilidade Operacional: * Cinética Rápida (15 min): Ideal para aplicações em RT-qPCR (análise quantitativa).
- Cinética Estendida (30 min): Recomendada para RT-PCR convencional e clonagem.
- Preservação da Integridade do RNA: O método de inativação térmica simultânea da Transcriptase Reversa, do Inibidor de RNase (RI) e do agente de remoção de gDNA evita a degradação térmica do RNA molde, comum em protocolos tradicionais que exigem pré-tratamento prolongado com DNase I.
- Alta Processividade: Capacidade de síntese de transcritos de até 12 kb.
- Otimização de Manuseio: Redução de etapas de pipetagem, minimizando erros experimentais.

Aplicações:

- Detecção de genes com alta e baixa cópia

Componentes do kit

Componente	Volume (XP720-01)
RT/RI Enzyme Mix	100µl
gDNA Remover	100µl
2xTS Reaction Mix	1ml
Random Primer (N9) 0,1µg/µl	100µl
Anchored oligo(dT) ₁₈ Primer 0,5µg/µl	100µl
Água	1ml

Realizar uma breve centrifugação (spin) antes de utilizar cada componente

Síntese do cDNA e Remoção do DNA Genômico

1. Preparo da reação

Componente	Volume
Total RNA/mRNA	0.1 ng-5 µg/10 pg-500 ng
Anchored oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µl
ou Random Primer (N9) (0.1 µg/µl)	1 µl
ou GSP	2pmol
2xTS Reaction Mix	10µl
RT/RI Enzyme Mix	1 µl
gDNA Remover	1 µl
Água	Variável
Volume Total	20 µl

2. Homogeneização da Reação

Misture o conteúdo dos tubos delicadamente por inversão ou pulso de vortex. Certifique-se de que todos os componentes estejam devidamente solubilizados antes de iniciar os ciclos térmicos.

3. Condições de Incubação (Transcrição Reversa)

A temperatura e o tempo de incubação variam conforme o primer utilizado e a aplicação à jusante (downstream):

- Oligo(dT)₁₈ ou Primers Gene-Específicos (GSP): incubar a 42°C por 15 minutos (para qPCR) ou 42°C por 30 minutos.

- Random Primers (Hexâmeros Aleatórios): incubar a 25°C por 10 minutos. Após esse período, incubar a 42°C por 15 minutos (para qPCR) ou a 42°C por 30 minutos (para PCR).

4. Inativação Térmica Simultânea

Incubar a mistura reacional a 85°C por 2 minutos. Este passo promove a inativação completa e simultânea do sistema enzimático (Transcriptase Reversa / Inibidor de RNase) e do agente de remoção de gDNA, preparando o cDNA para as etapas subsequentes de amplificação.

Condições de qPCR recomendados (tomando como exemplo uma reação de 20 µl)

Componente	Volume	Concentração Final
Amostra	Variável	Como requerido
Primer Forward (10 µM)	0,4µl	0,2µM
Primer Reverse (10 µM)	0,4µl	0,2µM
2x Green qPCR Mix	10µl	1X
Reference Passiva (50x) - opcional	0,4µl	1X
Água	Variável	-
Volume total	20µl	-

qPCR (método em três etapas)		
94°C	30 segundos	40-45 ciclos
94°C	5 segundos	
50-60°C	15 segundos*	
72°C	10 segundos*	
Estágio de Dissociação		

qPCR (método em duas etapas)		
94°C	30 segundos	40-45 ciclos
94°C	5 segundos	
60°C	30 segundos*	
Estágio de Dissociação		

Para instrumentos ABI, o tempo de leitura é o seguinte (Sinais fluorescentes podem ser coletados durante a etapa de anelamento ou extensão no método de três etapas):

- * Para o ABI Prism 7700/7900, defina o tempo de leitura para 30 segundos.
- * Para o ABI Prism 7000/7300, defina o tempo de leitura para 31 segundos.
- * Para o ABI Prism 7500, ajuste o tempo de leitura para 34 segundos.
- * Para o ABI VIIA 7, defina o tempo de leitura em pelo menos 19 segundos.

A qPCR de três etapas é mais adequada para ensaios de maior eficiência de amplificação.

A qPCR em duas etapas é mais adequada para ensaios de maior especificidade.

Condições de PCR recomendados (tomando como exemplo o sistema de reação de 50 µl)

Componente	Volume	Concentração Final
Amostra	Variável	Como requerido
Primer Forward (10 µM)	1µl	0,2µM
Primer Reverse (10 µM)	1µl	0,2µM
2X PCR supermix	25µl	1X
Água	Variável	-
Volume total	20µl	-

PCR		
94°C	2-5 minutos	35-40 ciclos
94°C	30 segundos	
50-60°C	30 segundos	
72°C	1-2kb/min	
72°C	5-10 minutos	

Notas:

- Evite contaminação por RNase.
- Para garantir a transcrição reversa bem-sucedida, utilize modelos de RNA de alta qualidade.
- Para moldes complexos de RNA, ou para obter maior eficiência de síntese, recomenda-se misturar primeiro o amostra de RNA, primers e água, incubar a 65°C por 5 minutos e colocar no gelo por 2 minutos antes de adicionar outros componentes da reação.
- Misturar todos os componentes da reação em uma única etapa pode completar a maioria das reações de transcrição reversa. Para modelos complexos de RNA, ou para obter maior eficiência de síntese, recomenda-se adicionar etapas de incubação térmica para o amostra e os primers conforme a instrução.
- Se o produto for usado para qPCR, para alguns genes especiais, o tempo de incubação a 42 °C pode ser de 30 minutos para obter melhores resultados.

Contatos:

- **Website:** www.genexplore.com.br
- **E-mail:** suporte@genexplore.com.br
- **Importado por:** Genexplore, Comércio, Importação e Exportação Ltda
CNPJ: 62.359.822/0001-10 / I.E: 155.425.101.110
Av: Primeiro de Maio 379 – sala 04 – Ribeirão Preto – SP – 14030-390