

Retrotranscriptasa M-MLV

(Cod 0701)

Introducción

M-MLV es una ADN polimerasa dependiente de ARN y consta de una subunidad única con un peso molecular de 71 kDa. Se puede utilizar en Síntesis de cDNA con ARN o ARN:ADN Híbridos como molde. MMLV es la transcriptasa inversa preferida para plantillas de mRNA largas (>5kb), ya que no posee actividad RNasa H. Reduce en gran medida la degradación del RNA y por lo tanto aumenta la productividad.

Aplicaciones

Síntesis de cDNA de primera cadena, RT-PCR en un solo paso, RACE PCR en 3' y 5' (Rapid Amplification in cDNA Ends) y extensión principal, construcción de bibliotecas de cDNA.

Unidad enzimática

Se define como la cantidad de enzima que incorpora 1 nmol de dNTP en 10 min a 37°C con poliA-poli (dT) 12-18 como primer-molde.

Protocolo

Síntesis de 1^{ra} cadena de cDNA

Se pueden utilizar 20 µl de sistema de reacción para la transcripción inversa de 1 a 5 µg de ARN total o de 50 a 500 ng de mRNA.

1) Agregue los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas.

- 1-5 µg de ARN total o 50-500 ng de mRNA
- Añadir ddH₂O libre de RNasa hasta 15 µl

2) Calentar a 70 °C durante 5 min para romper la estructura secundaria de ARN, luego colocar el tubo inmediatamente en hielo durante 2 min. Centrifugar brevemente y agregar

- 2 µl de oligo (dT)12-18 (10 µM), o 2 µl de cebadores aleatorios (10 µM), o 2 pmol de cebadores específicos
- 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM de pH 7)
- 5 µl de buffer 5X de primera copia

Paso opcional: si la cantidad de plantilla inicial es inferior a 50 ng, se deben agregar 0,5-1 µl de RNasin (40 U/µl).

3) Añadir 1 µl de M-MLV y mezclar con suavidad pipeteando; cuando utilice cebadores aleatorios, incube el tubo a 25°C durante 10 min.

4. Incubar a 42 °C durante 50 min.

5) Calentar la muestra a 95°C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Enfríe la muestra en hielo para experimentos posteriores o guárdela a -20 °C inmediatamente.

6) Diluir el sistema de reacción a 50 µl en ddH₂O libre de RNasa. Tome 2-5 µl para la amplificación por PCR.

Amplificación de PCR

Tome el 10% de la mezcla de reacción de síntesis de 1ra cadena de cDNA; una cantidad mayor no conduce a una amplificación de DNA eficiente y los inhibidores presentes en los productos de transcripción inversa pueden inhibir la PCR.

1. Prepare la mezcla de reacción agregando los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga:

Componente	Volumen
10x PCR Buffer 200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl)	5 µl
50 mM MgCl ₂	1.5 µl
dNTP (2.5 mM c/u)	1 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.4 µl
cDNA (mezcla 1 ^{ra} reacción)	2 µl
Agua desionizada	Hasta 50 µl

Para obtener un resultado óptimo la concentración de MgCl₂ debe optimizarse para la combinación de molde y primers específicos.

2. Mezclar suavemente y cubrir la reacción con una o dos gotas de aceite mineral libre de nucleasas para evitar la evaporación y condensación (el aceite mineral no es necesario si el termociclador posee tapa caliente).

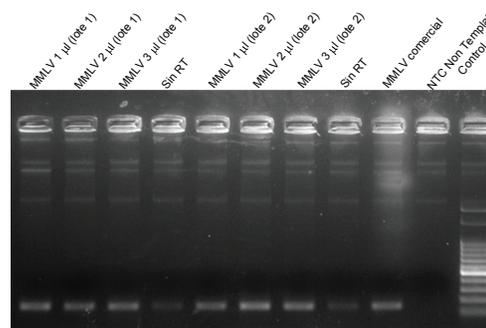
3. Desnaturalizar a 94°C durante 2 min.

4 Realizar la corrida de PCR entre 15 y 40 ciclos, con condiciones de hibridación y desnaturalización optimizadas para el molde y par de primers específicos.

Contenido	0701-1 10.000U	0701-2 20.000U
M-MLV (200 U/µl)	50 µl	100 µl
Buffer 5X (1 ^{ra} cadena) 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT	250 µl	500 µl

Materiales no provistos: nucleótidos, inhibidor de Ribonucleasa (RNasin), agua libre de RNAsas

Producto sólo para investigación y desarrollo



Comparativo de PCR de proteína FMR1 a partir de DNA amplificado con M-MLV Kalium

Biología Molecular - Proteínas

Biolumina - Reactivo Quimioluminiscente

Reactivo quimioluminiscente para la detección de antígenos específicos inmovilizados. Utiliza anticuerpos marcados con Horseradish Peroxidasa (HRP).

- ✓ **Alta sensibilidad:** Sistema de detección más sensible que los sistemas colorimétricos.
- ✓ **Alta resolución:** presenta un alto contraste en la señal generada.
- ✓ **Rapidez:** La proteína específica puede ser revelada en menos de un minuto de exposición.

IMAC Beads

Kalium ofrece soluciones para purificación de proteínas con partículas magnéticas. Son alternativas eficientes y específicas para obtener resultados de muestras biológicas complejas. También desarrollamos a requerimiento procesos para producción de proteínas para investigación, tanto de fuentes naturales como recombinantes.

Kit para purificación de proteínas por afinidad con metales pesados (Cu, Zn, Ni, Co). Aplica a proteínas recombinantes expresadas con la marca de His-tag como así también a proteínas con afinidad per-se para formar complejos con estos metales. Algunos ejemplos son, proteínas séricas (Zn, Cu, Ni), activador de plasminógeno (Zn), HSA (Cu), fibrinógeno (Zn), Concanavalina A (Cu), Avidina (Cu), Lisozimas (Ni), Mioglobinas (Zn, Cu), Proteína A (Cu), y algunos Interferones, entre otras (Purification of Proteins by IMAC, Sulkowski et.al, 1985)

Biología Molecular – Ácidos Nucleicos

M-MLV Transcriptasa Reversa

ADN polimerasa dependiente de ARN para la síntesis de cDNA con ARN o híbridos de ARN:ADN como molde. Es la transcriptasa inversa preferida para plantillas de mRNA largas (> a 5 KDa).

Quick-Zol - Purificación de RNA

Reactivo para extracción ARN total a partir de células y tejidos (sólidos o líquidos). Quick-Zol está optimizado para la obtención de RNA celular de gran integridad y pureza, libre de contaminación de DNA y proteínas. Brinda gran sensibilidad para la obtención de ARN celular de gran integridad y pureza, libre de contaminación de DNA y proteínas.

BioCapture NA Magnetic Extraction

Kit para extracción magnética de ácidos nucleicos a partir de hisopados o suspensiones celulares. **BioCapture NA** utiliza beads magnéticas recubiertas con sílica como tecnología rápida y eficiente para aislar ácidos nucleicos en cuatro pasos: lisis, extracción, lavado y elución.

Productos formulados y producidos en Argentina, sólo aplicables a I+D