**PROTOCOLO PARA REACCION DE PRIMERA CADENA DE cDNA**

RNasa H-Reverse transcriptase SUPERSCRIT ll

Transcriptasa de Virus de Leucemia de Roedor (Moloney Murine), sintetiza la primera cadena de cDNA.

Unidad de Enzima: Una unidad incorpora 1 nmol de dTTP en material ácido precipitable en 10 min a 37 ° C usando como templado un polyA y como primer un oligo dT25.

**TRATAMIENTO DEL RNA CON DNAsa I**

1 microgramo de RNA

1 microlitro de Buffer de reacción 10X para DNAsa I

1 microlitro de DNAsa I

H20 DEPC hasta 10 microlitros (para más microgramos de RNA aumentar los volúmenes proporcionalmente)

Incubar la reacción 15 minutos a temperatura ambiente

Inactivar agregando 1 microlitro de 25 mM de EDTA.

Calentar a 65°C 10 minutos.

**SINTESIS DE PRIMERA CADENA DE cDNA**

Se puede llevar acabo una reacción en un volumen de 20 microlitros para una cantidad de 1 a 5 microgramos de RNA total ó 50 a 500 ng de mRNA, con los siguientes elementos:

1 microlitro de oligo(dT) 12-18  a 500 microgramos/ml \*

1-5 microgramos de RNA total

H20 destilada estéril 12 microlitros

\*Alternativamente se pueden utilizar de 50 a 250 ng de random primers ó 2 pmol de primers gen específicos. El uso de random primers requiere una incubación a 25°C por 10 min. Antes de incubar a 42°C.

Calentar la mezcla a 70 °C por 10 min y pasar inmediatamente a hielo. Centrifugar brevemente y agregar lo siguiente:

4 microlitros de First Strand Buffer 5X

2 microlitros de 0.1 M DTT

1 microlitro de mezcla de dNTP´s 10 mM

Mezclar suavemente en incubar a 42°C por 2 min, agregar 1 microlitro(200U) de SuperScript II, mezclar por pipeteo suavemente.

Incubar 50 min a 42°C, inactivar la reacción calentando a 70°C por 15 min.

El cDNA generado puede utilizarse como templado para una reacción de PCR, la amplificación de fragmentos mayores a 1 kb puede requerir de la eliminación del RNA complementario al cDNA. Para esto, agregar 1 microlitro (2U) de RNasa H de *E. coli* e incubar a 37°C por 20 min.

Para la reacción de PCR utilice solamente 10% de la reacción de primera cadena. Agregar cantidades mayores no necesariamente aumenta la amplificación y puede reducir las cantidades de producto de PCR.

**REACCION DE PCR**

Para un volumen final de 100 microlitros agregar lo siguiente:

10 microlitro de buffer 10X para PCR

3 microlitros de dNTP´s a 10 micromolar

1 microlitro de primer directo 10 micromolar

1 microlitro de primer reverso 10 micromolar

1 microlitro de Taq polimerasa 5 U/microlitro

2 microlitros de cDNA

80 microlitros de H20 destilada

Mezclar suavemente y someter a un programa de amplificación que incluya una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min., y de 15 a 35 ciclos con temperaturas de alineamiento y tiempos de extensión determinados para cada enzima.