

1- Descrição

O kit **RT-PCR One-Step** *pht* fornece todos os componentes necessários para a conversão de RNA em cDNA de fita simples, seguida da amplificação por PCR, utilizando o cDNA gerado na primeira etapa como molde. Utiliza a enzima transcriptase reversa (RT) M-MLV recombinante e a enzima Taq DNA polimerase recombinante.

2- Apresentação

Composição	Código
RT-PCR One-Step Buffer (2X)	R8
Mix de Enzimas	Z7
DTT 100 mM	R14
Água Ultrapura	S3

Tipo de produto final: Amplicon

Tipo de amostra: RNA purificado

3- Condições de armazenamento e transporte

- O Kit **RT-PCR One-Step** pode ser transportado refrigerado em gelo gel ou em temperaturas inferiores. Manter ao abrigo da luz e umidade.

- A temperatura de armazenamento deve ser de **-20 °C** ou inferior.

4- Medidas 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** ou pelos telefones **(31) 99585-3050** e **(31) 3427-6413**.

5- Protocolo – RT-PCR

ATENÇÃO, mantenha o Mix de Enzimas no freezer até o momento do uso. Ao retirar o mix, coloque-o no gelo.

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

Reagente	Volume
RT-PCR One-step Buffer (2X)	10 µL
Primer Forward (Concentração de 5 a 10 µM)	1 µL
Primer Reverse (Concentração de 5 a 10 µM)	1 µL
Mix de Enzimas	1 µL
DTT 100 mM	1 µL
RNA purificado	1-6 µL
Água Ultrapura	Completar o volume para 20 µL

2- A reação deve ser incubada (recomendamos o uso do termociclador) com os tempos e temperaturas indicados pela tabela abaixo:

Exemplo de ciclagem para RT-PCR:

Temperatura	Tempo	Observação	
50 °C	20-60 min	Síntese do cDNA	
95 °C	5 min	O primeiro passo de desnaturação deve ter um tempo e temperatura maior para garantir a abertura das fitas de DNA.	
92 °C	30 s	Repetir 30-40x	Segundo passo de desnaturação.
50-63 °C	30 s		Anelamento dos primers no DNA alvo.
72 °C	30 s		Extensão com ação da Taq DNA pol
72 °C	5 min	Tempo extra de extensão para finalizar a formação completa dos amplicons.	
4-15 °C	∞	Para aguardar a retirada da reação do termociclador	

A ciclagem pode ser adaptada para sua reação, entretanto recomendamos manter a temperatura de extensão a 72°C.

3- O amplicon (produto da PCR) está pronto para ser utilizado ou armazenado a -20 °C para uso futuro.

Dúvidas? Ligue ou mande uma mensagem para o nosso Setor Técnico.

E-mail: pht@phoneutria.com.br

 **(31) 99585-3050**

Visite o nosso site:

