

9. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Luciana Correia de Almeida Regitano

A conversão enzimática de mRNA para cDNA foi descoberta na década de 1970 por Kacia, Ross, Verma e colaboradores (Sambrook, 2002).

A síntese da primeira fita de cDNA é realizada por uma enzima transcriptase reversa dependente de RNA, geralmente isoladas de vírus, que usa amostras de RNA mensageiro (poli A) ou RNA total como molde. Atualmente, diversas espécies de transcriptases reversas são comercialmente utilizadas, como Mo-MLV, ALV e *SuperScript® RT II* (manual do usuário, 2003).

Para que esta conversão seja feita, são necessários:

- dNTPs: altas concentrações de dNTPs são importantes para a obtenção de boa eficiência na síntese do cDNA. Em baixas concentrações (< 50 μ M) há decréscimo significativo na produção da primeira fita. Geralmente, são utilizados cerca de 200 a 250 μ M de cada dNTP (Maniatis, 1987).

- um oligonucleotídeo, sendo o mais utilizado o oligo dT, pois sintetiza a primeira fita a partir de RNAs de cadeia poli A (manual do usuário, 2003).

- tampão: a presença deste reagente é importante, pois a alteração do pH acarreta a diminuição da eficiência da incorporação e da produção de transcritos. O pH ótimo é geralmente 8,3. Já foi observado que pequenas alterações de pH, de até 0,5 resultam em diminuição de até 5X na produção do cDNA (Maniatis, 1987).

- $MgCl_2$: os cátions divalentes são importantes na transcrição reversa pois auxiliam na produção de transcritos completos em concentrações de 6 a 10 mM. Quando fragmentos muito longos serão transcritos, podem ser utilizados cátions

monovalentes, dentre eles, o mais indicado é o potássio, que auxiliam na manutenção da eficiência da transcrição.

- RNase OUT® (Invitrogen): degrada RNAses presentes durante a síntese do cDNA (Manual do usuário, 2003).

- DTT ou ditioneitol: é um agente redutor que tem como principal função proteger oxidação de enzimas e proteínas (Roche, 2004).

- RNase H: é utilizada no final da reação para remover híbridos RNA:cDNA com a função de aumentar a sensibilidade e a eficiência do PCR. A presença de RNase H durante a síntese do cDNA degrada o mRNA, causando um déficit na produção desta molécula. Por isso, foram desenvolvidas transcriptases reversas que apresentam atividade reduzida de RNase H durante a produção da primeira fita e que são adicionadas apenas no final da reação, para remoção de moléculas híbridas (Manual do usuário, 2003).

É importante considerar que para que este procedimento tenha sucesso, o RNA das amostras deve ser intacto e sua quantificação, precisa, para evitar variações na utilização deste molde em técnicas futuras, como por exemplo, em arranjos de DNA ou PCR quantitativo.

9.1.PROTOCOLO DE SÍNTESE DE CDNA

1. Descongelar e homogeneizar brevemente cada componente abaixo.

Preparar o *mix* RNA/*primer*:

Componente	Para uma amostra
Até 5 µg de RNA total	Máximo de 8 µL*
10 mM dNTP <i>mix</i>	1 µL
Oligo dT 0,5 µg/µL	1 µL
Água DEPC (do kit)	Completar para 10 µL*

*o volume deste *mix* deve ser 10 µL. Assim, o volume máximo de RNA a ser utilizado é 8 µL contendo de 1 ng a 5 µg de RNA total. Se for utilizado 8 µL, a água DEPC do kit não é adicionada ao *mix*.

2. Incubar a 65 °C por 5 minutos;
3. Esfriar em gelo por 1 minuto;
4. Preparar o *mix* de reação adicionando cada componente a partir da primeira linha da tabela. Este *mix* pode ser preparado em um tubo separado, junto com a preparação do *mix* anterior. Se isso for feito, mantê-lo sempre em gelo:

Componente	Para uma amostra
Buffer RT 10 X	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNAse out	1 µL
Total	9 µL

5. Adicionar os 9 µL do *mix* acima em cada tubo contendo o RNA/*primer*. Dar um *spin*;
6. Incubar a 42 °C por 2 minutos;
7. Adicionar 1 µL (50 U) da enzima *SuperScript* RTII em cada tubo

monovalentes, dentre eles, o mais indicado é o potássio, que auxiliam na manutenção da eficiência da transcrição.

- RNase OUT® (Invitrogen): degrada RNases presentes durante a síntese do cDNA (Manual do usuário, 2003).

- DTT ou ditioneitol: é um agente redutor que tem como principal função proteger oxidação de enzimas e proteínas (Roche, 2004).

- RNase H: é utilizada no final da reação para remover híbridos RNA:cDNA com a função de aumentar a sensibilidade e a eficiência do PCR. A presença de RNase H durante a síntese do cDNA degrada o mRNA, causando um déficit na produção desta molécula. Por isso, foram desenvolvidas transcriptases reversas que apresentam atividade reduzida de RNase H durante a produção da primeira fita e que são adicionadas apenas no final da reação, para remoção de moléculas híbridas (Manual do usuário, 2003).

É importante considerar que para que este procedimento tenha sucesso, o RNA das amostras deve ser intacto e sua quantificação, precisa, para evitar variações na utilização deste molde em técnicas futuras, como por exemplo, em arranjos de DNA ou PCR quantitativo.

9.1.PROTOCOLO DE SÍNTESE DE CDNA

1. Descongelar e homogeneizar brevemente cada componente abaixo.

Preparar o *mix* RNA/*primer*:

Componente	Para uma amostra
Até 5 µg de RNA total	Máximo de 8 µL*
10 mM dNTP <i>mix</i>	1 µL
Oligo dT 0,5 µg/µL	1 µL
Água DEPC (do kit)	Completar para 10 µL*

*o volume deste *mix* deve ser 10 µL. Assim, o volume máximo de RNA a ser utilizado é 8 µL contendo de 1 ng a 5 µg de RNA total. Se for utilizado 8 µL, a água DEPC do kit não é adicionada ao *mix*.

2. Incubar a 65 °C por 5 minutos;

3. Esfriar em gelo por 1 minuto;

4. Preparar o *mix* de reação adicionando cada componente a partir da primeira linha da tabela. Este *mix* pode ser preparado em um tubo separado, junto com a preparação do *mix* anterior. Se isso for feito, mantê-lo sempre em gelo:

Componente	Para uma amostra
Buffer RT 10 X	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNAse out	1 µL
Total	9 µL

5. Adicionar os 9 µL do *mix* acima em cada tubo contendo o RNA/*primer*. Dar um *spin*;

6. Incubar a 42 °C por 2 minutos;

7. Adicionar 1 µL (50 U) da enzima *SuperScript* RTII em cada tubo

obs. Os tubos não podem ser colocados em gelo para adição da enzima RTII. A temperatura deve continuar de 42 °C;

8. Incubar a 42 °C por 50 minutos;
9. Terminar a reação a 70 °C por 15 minutos;
10. Esfriar no gelo e dar um *spin*;
11. Adicionar 1 µL de RNase H e incubar por 20 minutos a 37 °C;
12. Estocar em freezer – 20 °C.

Componente	Volume (µL)
RTII	1
RTIII	1
RTIV	1
RTV	1
RTVI	1
RTVII	1
RTVIII	1
RTIX	1
RTX	1
RTXI	1
RTXII	1
RTXIII	1
RTXIV	1
RTXV	1
RTXVI	1
RTXVII	1
RTXVIII	1
RTXIX	1
RTXX	1
RTXXI	1
RTXXII	1
RTXXIII	1
RTXXIV	1
RTXXV	1
RTXXVI	1
RTXXVII	1
RTXXVIII	1
RTXXIX	1
RTXXX	1
RTXXXI	1
RTXXXII	1
RTXXXIII	1
RTXXXIV	1
RTXXXV	1
RTXXXVI	1
RTXXXVII	1
RTXXXVIII	1
RTXXXIX	1
RTXXXX	1
RTXXXXI	1
RTXXXXII	1
RTXXXXIII	1
RTXXXXIV	1
RTXXXXV	1
RTXXXXVI	1
RTXXXXVII	1
RTXXXXVIII	1
RTXXXXIX	1
RTXXXXX	1