



# Набор реактивов MMLV RT kit

Номер по каталогу SK021

Инструкция по применению

Набор реактивов MMLV RT kit предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

## Содержание

I. Описание . . . . .	1
II. Состав и условия хранения . . . . .	2
III. Оптимальные условия реакции синтеза первой цепи кДНК . . . . .	2
IV. Протокол обратной транскрипции (синтеза первой цепи кДНК) . . . . .	3
V. Оптимизация условий реакции . . . . .	5
VI. Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК . . . . .	6

## I. Описание

Набор реактивов предназначен для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице. Набор содержит обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей (MMLV ревертаза). Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. coli*, экспрессирующего ген MMLV ревертазы дикого типа.

### Свойства MMLV ревертазы

- Осуществляет синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице (РНК зависимая ДНК полимераза).
- Обладает слабой активностью РНКазы Н.
- Позволяет синтезировать фрагменты кДНК длиной до 5 т.п.о.
- Обеспечивает высокий выход кДНК: при использовании 100 ед. фермента на 1 мкг РНК выход реакции составляет не менее 100 нг первой цепи кДНК.

### Область применения набора

- Синтез первой цепи кДНК для последующей амплификации, в том числе в режиме «реального времени»
- Включение в цепь кДНК модифицированных нуклеотидов (приготовление меченных зондов)
- ОТ-ПЦР «в одной пробирке» (обратная транскрипция-ПЦР)
- ▶ *Входящий в набор 5x буфер для синтеза первой цепи кДНК не предназначен для реакции ОТ-ПЦР «в одной пробирке». Для этого приложения используйте протоколы и специализированный реакционный буфер для ОТ-ПЦР.*

## II. Состав и условия хранения

Набор рассчитан на 50 реакций (объем 20 мкл).

Компонент*	Количество
MMLV ревертаза, (MMLV RT, 100 ед/мкл)	50 мкл (5 000 ед.)
5x буфер для синтеза первой цепи (5X first strand buffer) (280 мМ Трис-НСl, рН 8.7; 375 мМ КСl; 30 мМ MgCl <sub>2</sub> )	220 мкл
DTT (20 мМ)	110 мкл
Смесь dNTP (dNTP mix, 10 мМ каждого)	120 мкл
Олиго(dT) праймер (Oligo(dT) <sub>17</sub> -primer, 20 мкМ)	50 мкл
Случайный декануклеотидный праймер (Random (dN) <sub>10</sub> -primer, 20 мкМ)	50 мкл
Буфер для разведения MMLV ревертазы (MMLV RT storage buffer) (50 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 300 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 мМ DTT; 50% глицерин; 0.01% Triton X-100)	500 мкл
Стерильная вода свободная от РНКаз (sterile RNase free water)	1.8 мл

\* Пробирки, содержащие указанные компоненты, подписаны по-английски; английские названия даны в скобках.

**Хранение и транспортировка:** -20°C

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.

## III. Оптимальные условия реакции синтеза первой цепи кДНК

- Температура: 37-42°C
- Время инкубации: 30-60 мин
- Рекомендуемое количество РНК-матрицы (поли(А)+ или тотальная РНК): 100 нг-2 мкг на 20 мкл реакционной смеси
- Рекомендуемое количество MMLV ревертазы на 20 мкл реакции: 50-100 ед.

## IV. Протокол обратной транскрипции (синтеза первой цепи кДНК)

▶ **Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!**

1) Приготовьте смесь следующих компонентов в стерильной пробирке:

X мкл Стерильная вода, свободная от РНКаз

1-6 мкл РНК матрица (0.5-2 мкг)

1-3 мкл праймер (20 мкМ)

---

9 мкл Суммарный объем первой части реакционной смеси

▶ Для выбора праймера см. раздел VI. «Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК» на стр. 6

2) Аккуратно перемешайте смесь, сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге.

3) Прогрейте смесь 2 мин при 70°C для расплавления вторичных структур РНК и перенесите образцы в лед. Сбросьте капли реакционной смеси со стенок пробирки на микроцентрифуге.

4) Добавьте 11 мкл предварительно подготовленной смеси следующего состава:

X мкл Стерильная вода, свободная от РНКаз

4 мкл 5x буфер для синтеза первой цепи

2 мкл смесь dNTP (10 мМ каждого)

2 мкл DTT (20 мМ)

1-3 мкл MMLV ревертаза (добавить в последнюю очередь!)

---

11 мкл Суммарный объем второй части реакционной смеси

▶ Для предотвращения возможной деградации проб рекомендуется добавить в реакцию ингибитор РНКаз (например, RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega; SUPERase-IN, Ambion).

▶ При использовании MMLV ревертазы в количестве менее 100 ед. на реакцию (см. рекомендации в разделе V. «Оптимизация условий реакции» на стр. 5), рекомендуется развести фермент до нужной

#### IV Протокол обратной транскрипции (синтеза первой цепи кДНК)

концентрации буфером для разведения так, чтобы на реакцию требовалось не менее 1 мкл раствора фермента. Это позволит избежать ошибок при отборе аликвот.

- 5) Аккуратно перемешайте смесь, сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге.
- 6) Инкубируйте реакционную смесь 30-60 мин при 37-42°C.
  - ▶ Реакцию следует проводить в амплификаторе с греющейся крышкой или в сухом термостате. В последнем случае наложите поверх реакционной смеси 1 каплю (15-20 мкл) минерального масла, чтобы объем реакции не изменился из-за испарения.
- 7) Для остановки реакции прогрейте смесь при 70°C в течение 10 мин.

---

Образец первой цепи кДНК может храниться до 3-х месяцев при -20°C или в течение года при -70°C. Многократное размораживание-замораживание образца может привести к его деградации. Поэтому мы рекомендуем разделить образец на аликвоты перед первым замораживанием.

Перед использованием аликвоту рекомендуется прогреть 2 мин при 65°C (для дезагрегации молекул кДНК), встряхнуть и собрать капли центрифугированием.

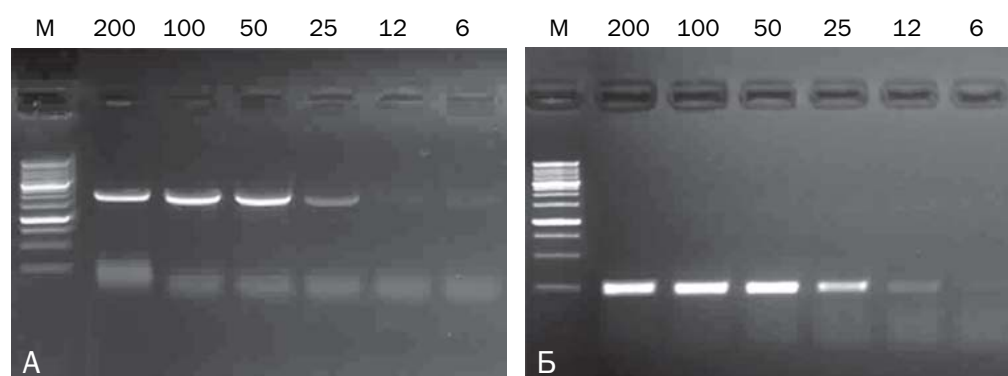
---

## V. Оптимизация условий реакции

- 1) В случае необходимости, объем реакционной смеси можно варьировать от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяя количество всех компонентов.
  - 2) Чем короче фрагмент кДНК, тем меньше фермента необходимо добавлять в реакцию (рис. 1). Рекомендуемые количества фермента для синтеза кДНК различной длины приведены в Таблице 1.
- При оптимизации условий синтеза длинных фрагментов кДНК нужно учесть, что увеличение количества фермента приводит к росту РНКазной активности. Вследствие этого, частичная деградация матрицы может произойти раньше, чем синтез фрагмента нужной длины. Поэтому для синтеза протяженных молекул кДНК рекомендуется использовать обратную транскриптазу Mint (кат.# SK003), лишенную РНКазной активности.

**Таблица 1. Рекомендуемое количество MMLV ревертазы на реакцию объемом 20 мкл.**

Длина синтезируемой кДНК	Количество РНК матрицы		
	< 500 нг	500 нг-2 мкг	> 2 мкг
50 - 600 п.о.	10-25 ед.	25-50 ед.	50-100 ед.
600 - 2000 п.о.	25-50 ед.	50-100 ед.	100-200 ед.
Более 2000 п.о.	50-100 ед.	100 ед.	200-300 ед.



**Рис. 1.** Результат амплификации фрагментов кДНК длиной 1800 п.о. (А) и 650 п.о. (Б), синтезированных с использованием различного количества MMLV ревертазы (суммарная РНК – 0,5 мкг; количество единиц MMLV ревертазы на реакцию показано над дорожками). М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder.

## VI Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК

- 3) Увеличение концентрации РНК-матрицы в реакционной смеси приводит к увеличению суммарного выхода продукта синтеза.
  - ▶ Если количество РНК-матрицы в реакционной смеси более 2 мкг на 20 мкл реакции, для увеличения выхода реакции рекомендуется увеличить не только концентрацию MMLV ревертазы, но и концентрацию праймера в 1.5-2 раза.
- 4) Для облегчения прохождения участков матрицы, содержащей GC-богатые участки и участки со сложной вторичной структурой, рекомендуется использовать случайный декануклеотидный праймер (Random(dN)<sub>10</sub>).
  - ▶ В случае сложных матриц температуру синтеза можно поднять до 45-47°C. Однако это может привести к снижению выхода реакции.

## VI. Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК

- 1) **Специфический праймер** используют для синтеза уникального фрагмента кДНК. Обычно применяется для количественной оценки фрагмента в пробах РНК и для диагностики.
- 2) **Олиго(dT) праймер** или **случайный декануклеотидный праймер (Random(dN)<sub>10</sub>)** используют для приготовления образцов тотальной кДНК.

Выход тотальной кДНК с случайного декануклеотидного праймера как правило выше, чем с олиго(dT) праймера, однако получаемые образцы кДНК содержат в 10-30 раз больше рибосомальных последовательностей, чем образцы кДНК, синтезированные с олиго(dT) праймера.

- **Олиго(dT) праймер** используют только для полиаденилированной РНК.

Олиго(dT) праймер используют для количественной оценки 3'-концевых фрагментов транскриптов методом ОТ-ПЦР. Как показано на рис. 2, амплификация 3'-концевых фрагментов транскриптов более эффективна в образцах кДНК, полученных с использованием олиго(dT) праймера по сравнению с Random(dN)<sub>10</sub> праймером.



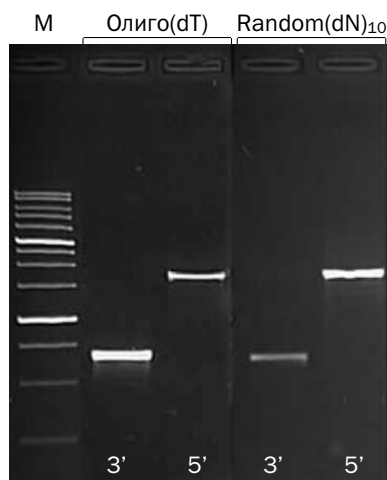


Рис. 2. Результат амплификации 3'- и 5'- концевых фрагментов кДНК, отстоящих на 200 п.о. и 4000 п.о. от поли(А) последовательности и полученных с использованием олиго(dT) или случайного декануклеотидного праймера. (РНК-матрица – 0,5 мг, MMLV ревертаза - 100 ед.) М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder.

Применение олиго(dT) праймера так же рекомендовано, когда планируется амплификация полноразмерных транскриптов или синтез второй цепи кДНК для приготовления кДНК-библиотек, обогащенных полноразмерными последовательностями.

- ▶ Для приготовления амплифицированных библиотек кДНК, обогащенных полноразмерными кодирующими последовательностями, рекомендуется использовать набор реактивов Mint (кат.# SK001) или обратную транскриптазу Mint (кат.# SK003).
- **Случайный декануклеотидный праймер** применяют для синтеза небольших (до 1000 п.о.) фрагментов кДНК на любой РНК-матрице, в том числе на неполиаденилированной РНК (например, бактериальной) или частично деградированной РНК. Случайный декануклеотидный праймер используют в тех случаях, когда не требуется получение полноразмерных транскриптов:
  - Подготовка образцов тотальной кДНК для количественной оценки содержания фрагментов транскрипта, удаленных от 3'-конца более чем на 2000 п.о., методом ОТ-ПЦР;
  - Введение модифицированных нуклеотидов в образцы кДНК (подготовка кДНК-зондов);
  - Синтез с РНК-матрицы, обладающей сложной вторичной структурой.

Амплификация 5'-концевых фрагментов транскриптов более эффективна в образцах кДНК, полученных с использованием случайного декануклеотидного праймера (рис. 2).

Для заметок

вер. 11 октября 2012 г.

**ЗАО Евроген**

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус 70

(Технопарк ИБХ)

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

[www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)