



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 ₂)	220 мкл
DTT (20 мМ)	110 мкл
Смесь dNTP (dNTP mix, 10 мМ каждого)	120 мкл
Олиго(dT) праймер (Oligo(dT) ₁₇ -primer, 20 мкМ)	50 мкл
Случайный декануклеотидный праймер (Random (dN) ₁₀ -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.

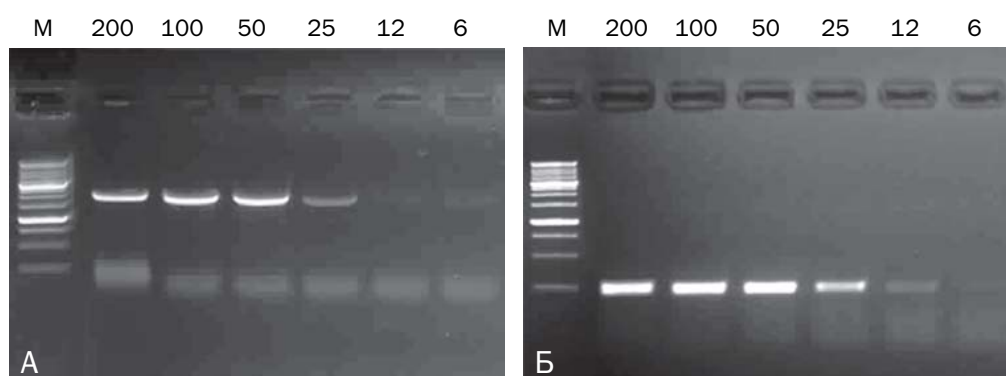


Рис. 1. Результат амплификации фрагментов кДНК длиной 1800 п.о. (А) и 650 п.о. (Б), синтезированных с использованием различного количества MMLV ревертазы (суммарная РНК – 0,5 мкг; количество единиц MMLV ревертазы на реакцию показано над дорожками). М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder.

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)₁₀).
 - ▶ 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)₁₀)** 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)₁₀ праймером.

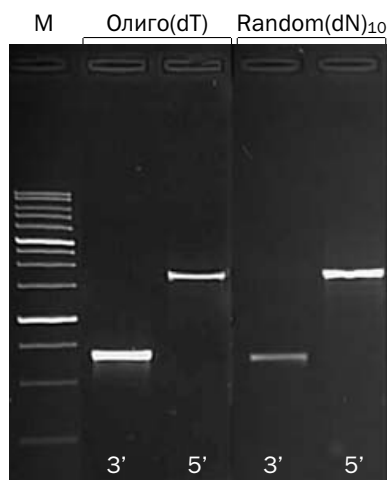


Рис. 2. Результат амплификации 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК, отстоящих на 200 п.о. и 4000 п.о. от поли(А) последовательности и полученных с использованием олиго(dТ) или случайного декануклеотидного праймера. (РНК-матрица – 0,5 мг, MMLV ревертаза - 100 ед.) М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder.

Применение олиго(dТ) 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:
 - Приготовление 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 (приготовление 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