

Обратная транскриптаза Mint

Обратная транскриптаза MINT (MINT ревертаза) является РНК-зависимой ДНК полимеразой и используется для синтеза первой цепи комплиментарной ДНК с одноцепочечной РНК матрицы. Для инициации реакции необходим олигодезоксинуклеотид (специфический или случайный праймер).

Особенностью MINT ревертазы является ее способность после завершения синтеза молекулы кДНК нематрично присоединять к 3'-концу первой цепи кДНК несколько дезоксинуклеотидов (преимущественно G или C), что позволяет использовать первую цепь для синтеза полноразмерных библиотек кДНК и клонирования 5'-концов кДНК (5'-RACE).

Продукт	Кат. #	Концентр. фермента	Кол-во ед.
MINT ревертаза	SK003	200 ед./мкл	20000 ед.

Хранение и транспортировка: при -20°C.

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

Перечень компонентов

- MINT ревертаза – 100 мкл;
- 5x MINT буфер – 220 мкл;
- 20 mM DTT – 110 мкл;
- 10x смесь dNTPs* – 120 мкл;
- Вода, свободная от РНКаз – 1.8 мл.

*dNTP – смесь солей 3'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов. Концентрация каждого трифосфата – 10 ммоль.

Область применения

- Синтез первой цепи кДНК с дальнейшей возможностью получения полноразмерных кДНК библиотек;
- ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-ПЦР);
- Мечение кДНК различными мечеными нуклеотидами (радиоактивными и нерадиоактивными).

Преимущества MINT ревертазы:

- Лишена РНКазной активности (RNaseH-);
- Обладает повышенной термической стабильностью (42-45°C);
- Обеспечивает высокий выход кДНК;
- Обладает высокой процессивностью (синтезирует кДНК длиной до 7.5 т.п.о.).

Протокол обратной транскрипции (синтез первой цепи кДНК)

Реакцию рекомендуется проводить в объеме 20 мкл. При необходимости объем реакции можно уменьшить до 10 мкл, уменьшив в 2 раза количество всех компонентов смеси.

1. Смешайте в пробирке следующие компоненты:

- | | |
|----------|---|
| РНК: | poly(A)+ РНК – 50нг-1мкг
или тотальная РНК – 0.5-5 мкг; |
| Праймер: | 4 мкл олиго(dT) праймера (20 мкМ)
или 2 мкл специфического праймера (10 мкМ)
или 2 мкл случайной затравки (20 мкМ); |
| Вода: | Доведите объем до 10 мкл водой,
свободной от РНКаз. |

2. Прогрейте смесь 2 мин на 70°C, перенесите образцы в лед.

3. Добавьте 8 мкл предварительно подготовленной смеси:
 - 4 мкл 5x MINT буфера
 - 2 мкл смеси dNTPs
 - 2 мкл DTT (20 мМ)
4. Перемешайте смесь с помощью пипетки, стряхните капли на микроцентрифуге.
5. Добавьте 2 мкл MINT ревертазы, перемешайте и, при необходимости, стряхните капли на микроцентрифуге.
6. Наслоите поверх реакционной смеси 1 каплю (15-20 мкл) минерального масла для ПЦР, чтобы объем реакции не изменился из-за испарения.
7. Инкубируйте реакционную смесь 2 часа при 42°C.

При необходимости, реакцию можно остановить нагреванием смеси до 70°C в течение 15 мин., после чего охладить во льду и заморозить.

Полученная первая цепь кДНК может быть использована в качестве матрицы для ПЦР (рекомендуемое конечное разведение – 100-150 раз), для Нозерн блота, для синтеза 2-й цепи кДНК, для клонирования концов кДНК (RACE), и пр.

Условия хранения первой цепи кДНК

Первая цепь кДНК может храниться до 3-х месяцев на -20°C, для более долгосрочного хранения используйте -70°C.

Перед каждым использованием пробирку необходимо прогреть 2 мин. на 65°C, встряхнуть и собрать капли центрифугированием.

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