

MMLV RT kit

Набор реактивов для синтеза первой цепи кДНК

Номер по каталогу:
SK021 — на 50 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	3
2. Область применения.....	3
3. Состав	3
4. Условия хранения и транспортировки	3
5. Количество реакций	3
6. Метод	4
7. Основные характеристики	4
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	4
9. Биологический материал	4
10. Протокол.....	5
11. Приложение	6

1. Назначение

Набор предназначен для синтеза первой цепи комплементарной ДНК с одноцепочечной матрицы РНК. Обратная транскриптаза (ревертаза) MMLV получена из штамма *E. coli*, экспрессирующего ген *pol* вируса лейкемии мышей MMLV. Особенностью транскриптазы MMLV является наличие слабой активности РНКазы H.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Область применения

- Синтез первой цепи кДНК с дальнейшей возможностью амплификации, клонирования и экспрессии.
- Синтез первой цепи кДНК с последующим анализом с помощью ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

3. Состав

Компоненты набора	Количество
MMLV Reverse Transcriptase	50 µl
5X First strand buffer	220 µl
DTT (20 mM)	110 µl
dNTP mix (10 mM each)	120 µl
Oligo(dT) ₁₅ -primer (20 µM)	100 µl
Random(dN) ₁₀ -primer (20 µM)	100 µl
MMLV Storage Buffer	0.5 ml
Deionized water, nuclease-free	1.5 ml

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 50 реакций объемом 20 мкл с использованием 100 е.а. фермента.

6. Метод

Для проведения реакции обратной транскрипции необходимы: РНК, ДНК-затравка (специфический, Oligo(dT)_{15} или Random(dN)_{10} праймеры), ревертаза, ДТТ, dNTP и реакционный буфер. РНК и ДНК-затравка по типу комплементарности образуют гетеродуплекс, который распознается ревертазой. К 3' концу ДНК-затравки, соблюдая принцип комплементарности, ревертаза последовательно присоединяет дезоксинуклеотиды, достраивая цепь ДНК. По окончании полимеразной реакции домен ревертазы, обладающий активностью РНКазы Н, гидролизует РНК цепь в составе гетеродуплекса РНК-ДНК, и ревертаза переходит на следующую ДНК-затравку, освобождая оцДНК. Таким образом, в ходе реакции обратной транскрипции нарабатывается кДНК, комплементарная РНК-матрице.

7. Основные характеристики

- Оптимальная температура работы: 37 °С.
- Длина синтезируемой кДНК: до 8 т.п.о.
- Активность РНКазы Н: присутствует слабая активность.
- Время реакции: 60 минут.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твердотельный термостат или амплификатор.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы объемом от 1 до 20 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Минеральное масло (если отсутствует амплификатор с нагревающейся крышкой).

9. Биологический материал

- Тотальная РНК высокого качества: без примесей ДНК, на агарозном геле РНК должна визуализироваться в виде четких хорошо различимых полос, $A_{260}/A_{280} \geq 2$, $A_{260}/A_{230} \geq 2.1$ (для выделения РНК рекомендуется использовать набор RNA Solo (кат. ## BC034T/M, Евроген).
- Количество биоматериала: от 50 нг до 2.5 мкг.

10. Протокол

Общее время работы: 1.5 часа.

Внимание! Все манипуляции с РНК проводить в зоне, свободной от РНКаз. Во время работы использовать перчатки, наконечники с фильтром и другой лабораторный пластик, свободный от РНКаз.

В процессе работы РНК и компоненты набора держать на льду.

Рекомендации по проведению обратной транскрипции:

- Проводите реакцию в объеме 20 мкл. При необходимости объем реакции можно уменьшить до 10 мкл, уменьшив в 2 раза количество всех компонентов смеси, кроме РНК.
- В каждую постановку включайте реакцию NoRT (без ревертазы) для контроля контаминации образца РНК примесью ДНК и реакцию NTC (без РНК) для контроля контаминации реакционной смеси.

1. Смешайте в пробирке следующие компоненты:

РНК: 50 нг — 2.5 мкг тотальной РНК;
Праймер: 2 мкл Oligo(dT)₁₅-primer (20 мкМ)
или 2 мкл специфического праймера (10 мкМ)
или 2 мкл Random(dN)₁₀-primer (20 мкМ);
Вода: Доведите объем до 11 мкл водой
(Deionized water, nuclease-free).

2. Прогрейте смесь 2 минуты при 70 °С, перенесите образцы в лед.

3. Добавьте 9 мкл предварительно подготовленной смеси:

4 мкл 5X First strand buffer;
2 мкл dNTP mix (10 mM each);
2 мкл DTT (20 mM);
1 мкл* MMLV Reverse Transcriptase (добавить в последнюю очередь!).

* Концентрация фермента — 100 е.а./мкл. На реакцию объемом 20 мкл рекомендованное количество ревертазы MMLV — 100 е.а. При использовании менее 100 е.а. на реакцию, рекомендуется развести ревертазу с помощью «MMLV Storage buffer» таким образом, чтобы на реакцию требовалось от 1 до 3 мкл фермента.

Для подбора количества е.а. ревертазы и оптимизации условий реакции см. п. 11.1.

► Рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген).

4. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.

5. Проведите инкубацию:

37 °С — 60 минут;

70 °С — 10 минут, после чего охладить во льду.

- Для сохранения объема реакции рекомендуется добавлять минеральное масло для ПЦР (15–20 мкл) и/или использовать амплификатор с нагревающейся крышкой.

Полученная первая цепь кДНК готова к использованию:

- в качестве матрицы для ПЦР (рекомендуемое количество кДНК в ПЦР: 1–2 мкл в реакцию объемом 25 мкл или 2–4 мкл — в 50 мкл);
- для Нозерн-блота, для синтеза 2-й цепи кДНК;
- для клонирования концов кДНК (RACE) и пр.

Избегайте избыточных циклов замораживания-размораживания кДНК. Перед длительным хранением кДНК рекомендуется распределить на аликвоты и заморозить.

кДНК может храниться до 3-х месяцев при -20°C , более длительное хранение возможно при -70°C . После размораживания прогреть аликвоту кДНК в течение 2 минут при 65°C .

11. Приложение

11.1. Оптимизация условий реакции

1.1. Чем короче целевой фрагмент кДНК, тем меньше фермента необходимо добавлять в реакцию. Рекомендуемые количества фермента для синтеза кДНК различной длины приведены в таблице:

Длина синтезируемой кДНК	Количество РНК матрицы		
	50–500 нг	500 нг – 2 мкг	2–2.5 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.
> 2000 п.о.	50–100 ед.	100 ед.	200–300 ед.

При оптимизации условий синтеза длинных фрагментов кДНК важно учесть, что увеличение количества фермента приводит к росту РНКазной активности. Вследствие этого, частичная дегградация матрицы может произойти раньше, чем синтез фрагмента нужной длины. Поэтому для синтеза длинных молекул кДНК рекомендуется использовать набор реактивов для синтеза кДНК Mint (кат. # SK001, Евроген), обратную транскриптазу Mint (кат. # SK003, Евроген) или Magnus (кат. ## SK006S/M, Евроген).

1.2. 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.

1.3. Для облегчения прохождения участков матрицы, содержащей GC-богатые участки и участки со сложной вторичной структурой, рекомендуется использовать ревертазу Magnus (кат. ## SK006S/M, Евrogen).

11.2. Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК

2.1. **Специфический праймер** используют для синтеза уникального фрагмента кДНК. Обычно применяется для количественной оценки фрагмента в пробах РНК и для диагностики.

2.2. **Олиго(dT)₁₅ праймер** или **Random(dN)₁₀ праймер** используют для приготовления образцов тотальной кДНК.

Выход тотальной кДНК с Random(dN)₁₀ праймера как правило выше, чем с Oligo(dT)₁₅ праймера, однако получаемые образцы кДНК содержат в 10–30 раз больше рибосомальных последовательностей, чем образцы кДНК, синтезированные с Oligo(dT)₁₅ праймера.

Аmplification 5'-концевых фрагментов транскриптов более эффективна в образцах кДНК, полученных с использованием Random(dN)₁₀ праймера.

Oligo(dT)₁₅ праймер используют:

- только для полиаденилированной РНК;
- для количественной оценки 3'-концевых фрагментов транскриптов методом ОТ-ПЦР;
- для амплификации полноразмерных транскриптов или синтеза второй цепи кДНК для приготовления кДНК-библиотек, обогащенных полноразмерными последовательностями.

Random(dN)₁₀ праймер используют:

- для синтеза небольших (до 1 000 п.о.) фрагментов кДНК на любой РНК-матрице, в том числе на неполиаденилированной РНК (например, бактериальной) или частично деградированной РНК;
- в случаях, когда не требуется получение полноразмерных транскриптов:
 - Приготовление образцов тотальной кДНК для количественной оценки содержания фрагментов транскрипта, удаленных от 3'-конца более чем на 2 000 п.о., методом ОТ-ПЦР;
 - Синтез с РНК-матрицы, обладающей сложной вторичной структурой.

Наборы и сервисы Евроген

Н – наборы

С – сервисы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н**

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н**

Синтез и амплификация кДНК **Н С**

Клонирование ДНК **Н С**

Выявление контаминации микоплазмой **Н**

Оценка ДНК **Н**

Нормализация кДНК **Н С**

Практикум по генной инженерии **Н**

Генотипирование **Н**

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С**

Секвенирование по Сэнгеру **С**

NGS секвенирование **С**

Синтез генов **С**

Сайт-направленный мутагенез **С**

Синтез органических соединений **С**

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

**Подробную информацию о наших продуктах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru**

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru