

Обратная транскриптаза MMLV

Кат. ## SK022S, SK022L

Версия 3 от 27 октября 2023 г.

Обратная транскриптаза (ревертаза) MMLV предназначена для синтеза первой цепи комплементарной ДНК с одноцепочечной матрицы РНК.

Ревертаза 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.

Состав

Компонент	SK022S 10 000 е.а.	SK022L 50 000 е.а.
MMLV Reverse Transcriptase	100 µl	500 µl (5 x 100 µl)
5X First strand buffer	400 µl	2 ml (5 x 400 µl)
DTT (20 mM)	200 µl	1 ml (5 x 200 µl)

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: -20°C .

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

Количество реакций

SK022S: 100 реакций объемом 20 мкл или 200 реакций объемом 10 мкл.

SK022L: 500 реакций объемом 20 мкл или 1 000 реакций объемом 10 мкл.

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).

Основные характеристики

- Оптимальная температура работы: 37°C .
- Длина синтезируемой кДНК: до 8 т.п.о.*
- Количество биоматериала: от 50 нг до 2.5 мкг тотальной РНК.
- Активность РНКазы Н: присутствует слабая активность.
- Время реакции: 60 минут.

* При условии использования РНК высокого качества (РНК должна быть очищена от ДНК и визуализироваться на агарозном геле в виде четких хорошо различимых полос, $A260/280 \geq 2$, $A260/230 \geq 2.1$). Для выделения РНК рекомендуется использовать набор RNA Solo (кат. ## BC034T/M, Евроген).

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 общей 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. Прогреть 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!).

▶ Рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EKO05S/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 .

Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
SB001	Oligo(dT) ₁₅ -primer	250 мкл (5 x 50 мкл), 5 нмоль
SB002	Random(dN) ₁₀ -primer	250 мкл (5 x 50 мкл), 5 нмоль
PB006S	Смесь dNTP (10 mM каждого)	200 мкл, 2 мкмоль
PB006L		2 мл (10 x 200 мкл), 20 мкмоль
BC034T	RNA Solo	10 выделений
BC034S		50 выделений
EK005S	Ингибитор РНКаз RiboCare	50 реакций
EK005M		250 реакций

ЗАО Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15

Тел.: +7 (495) 784-7084

order@evrogen.ru

www.evrogen.ru