

Обратная транскриптаза Magnus

Кат. ## SK006S, SK006M

Версия 2 от 12 апреля 2023 г.

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

Обратная транскриптаза Magnus — модифицированная ревертаза MMLV. Особенностью Magnus является повышенная термостойкость и отсутствие активности РНКазы H, что позволяет:

- Увеличить температуру обратной транскрипции для повышения специфичности реакции.
- Проводить синтез кДНК на GC-богатых областях и на матрицах со сложной вторичной структурой.
- Получать кДНК длиной до 12 000 п.о.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	SK006S 10 000 е.а.	SK006M 50 000 е.а.
Magnus Reverse Transcriptase	100 µl	500 µl (5 x 100 µl)
5X First strand buffer	220 µl	1.1 ml (5 x 220 µl)
DTT (20 mM)	110 µl	550 µl (5 x 110 µl)
dNTP mix (10 mM each)	200 µl	600 µl (3 x 200 µl)
Deionized water, nuclease-free	1.5 ml	3 ml (2 x 1.5 ml)

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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

Количество реакций

SK006S: 50 реакций объемом 20 мкл или 100 реакций объемом 10 мкл.

SK006M: 250 реакций объемом 20 мкл или 500 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).

Частные случаи применения: синтез первой цепи кДНК-копии РНК-вирусов для последующей качественной или количественной оценки.

Основные характеристики

- Оптимальная температура работы: 55–60 °С.
- Длина синтезируемой кДНК: до 12 т.п.о.*
- Количество биоматериала: от 50 нг до 5 мкг тотальной РНК.
- Активность РНКазы Н: отсутствует.
- Время реакции: 15 мин.

* При условии использования РНК высокого качества (РНК должна быть очищена от ДНК и визуализироваться на агарозном геле в виде четких хорошо различимых полос, $A_{260}/_{280} \geq 2$, $A_{260}/_{230} \geq 2.1$. Для выделения РНК рекомендуется использовать набор RNA Solo (кат. ## BC034T/M, Евроген).

Протокол

Общее время работы: 40 минут.

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 — 5 мкг тотальной РНК;
Праймер:	4 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 10 мкл водой (Deionized water, nuclease-free).

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

3. Добавьте 10 мкл предварительно подготовленной смеси:

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

► *Рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## ЕК005S/М, Евrogen).*

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

5. Проведите инкубацию:

55 °С** — 15 минут***	при использовании Oligo (dT) праймера или случайной затравки;
70 °С — 5 минут.	

** При использовании специфического праймера температурный диапазон может варьироваться от 55 °С до 60 °С (в зависимости от последовательности и температуры отжига праймера).

*** Допускается увеличение времени инкубации до 30 минут при работе с низкими концентрациями матрицы и необходимости синтезировать кДНК длиной 12 000 нуклеотидов.

- 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 °С, более длительное хранение возможно при –70 °С. После размораживания прогреть аликвоту кДНК в течение 2 минут при 65 °С.

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
BC034T	RNA Solo	10 выделений
BC034S	RNA Solo	50 выделений
EK005S	Ингибитор РНКаз RiboCare	50 реакций
EK005M	Ингибитор РНКаз RiboCare	250 реакций

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