

Обратная транскриптаза Mint

Кат. # SK003

Версия 5 от 12 апреля 2023 г.

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

Обратная транскриптаза Mint — модифицированная ревертаза MMLV. Особенностью Mint является отсутствие активности РНКазы H и способность нематрично присоединять к 3'-концу первой цепи кДНК несколько дезоксинуклеотидов (преимущественно G или C) после завершения синтеза, что позволяет использовать первую цепь для синтеза полноразмерных кДНК библиотек и клонирования 5'-концов кДНК (5'-RACE) — см. наборы кат. ## SK001, SK005, SKS03, SK004, Евроген.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	SK003 20 000 е. а.
Mint Reverse Transcriptase	100 µl
5X First strand buffer	220 µl
DTT (20 mM)	110 µl
dNTP mix (10 mM each)	120 µl
Deionized water, nuclease-free	1.5 ml

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: -20°C .

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

Количество реакций

Набор SK003 рассчитан на 50 реакций объемом 20 мкл или 100 реакций объемом 10 мкл.

Область применения

- Синтез первой цепи кДНК для дальнейшего получения полноразмерных кДНК библиотек.
- 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: 42°C .
- Длина синтезируемой кДНК: до 8 т.п.о.*
- Количество биоматериала: от 250 нг до 5 мкг тотальной РНК.
- Активность РНКазы Н: отсутствует.
- Время реакции: 1 час.

* 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: 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:	250 нг — 5 мкг totalной 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.

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	Mint Reverse Transcriptase (добавить в последнюю очередь!).

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

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

4. Проведите инкубацию:

42 °С	— 1 час;
70 °С	— 15 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
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