

MMLV RT kit

Краткий протокол

для постановки большого количества образцов

(пробоподготовка для диагностики РНК-содержащих вирусов)

Кат. # SK021

Версия 1 от 29 апреля 2020 г.

Для удобства работы с большим количеством проб можно заранее приготовить премикс без фермента MMLV. Премикс можно хранить в замороженном виде в течение 1 недели, размораживая перед использованием.

ВНИМАНИЕ! MMLV РЕВЕРТАЗУ НЕЛЬЗЯ ЗАМОРАЖИВАТЬ В РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ. ЕЕ ДОБАВЛЯЮТ НЕПОСРЕДСТВЕННО ПЕРЕД ПОСТАНОВКОЙ РЕАКЦИИ.

Перед первой постановкой рекомендуем ознакомиться с полной версией инструкции:

https://evrogen.ru/kit-user-manuals/MMLV_SK021.pdf

1. Приготовление премикса без фермента

Реакция синтеза кДНК рассчитана на объем 20 мкл. При необходимости можно пересчитать на объем 10 мкл.

1. Приготовьте премикс без MMLV ревертазы из расчета:

Компонент реакции	Количество на 1 реакцию объемом 20 мкл
5X буфер для синтеза первой цепи	4 мкл
Смесь dNTP (10 мМ)	2 мкл
Random (dN) ₁₀ -primer	1 мкл
DTT	2 мкл

2. Рекомендуется разделить премикс на аликвоты, которые впоследствии будут сразу использоваться на одну серию постановок.

3. Премикс допустимо хранить при -20°C не более 1 недели. Допускается 1-2 цикла заморозки-разморозки.

2. Постановка реакции обратной транскрипции

1. Разморозьте приготовленный заранее премикс без фермента и хорошо перемешайте на вортексе. Сбросьте капли центрифугированием.
2. Достаньте MMLV ревертазу из морозильника и поместите в охлажденный штатив/в лед.
3. Исходя из числа образцов в постановке, смешайте премикс и MMLV ревертазу в соотношении: на один образец – 9 мкл смеси и 0.5 мкл MMLV ревертазы. Аккуратно перемешайте на вортексе и сбросьте капли.

ВНИМАНИЕ! ДОПУСКАЕТСЯ КРАТКОВРЕМЕННОЕ ХРАНЕНИЕ СМЕСИ С MMLV РЕВЕРТАЗОЙ ПРИ +4 °С В ТЕЧЕНИЕ НЕ БОЛЕЕ 8 ЧАСОВ. НЕЛЬЗЯ ЗАМОРАЖИВАТЬ РЕАКЦИОННУЮ СМЕСЬ С ФЕРМЕНТОМ.

4. Разнесите смесь с ферментом по пробиркам по 9 мкл.
5. Образцы РНК прогрейте при +60 °С в течение 3 мин.
6. В каждую пробирку с реакционной смесью добавьте 11 мкл образца (выделенный образец РНК, вода или контрольный образец). Аккуратно перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге.
7. Инкубируйте реакционную смесь при +37 °С в течение 30 мин.
8. Для остановки реакции прогрейте смесь при +70 °С в течение 2 мин.
9. После окончания реакции рекомендуется разбавить реакцию водой в 5 раз. Для этого добавьте в каждую пробирку по 80 мкл воды.

Полученную разбавленную кДНК используйте для постановки ПЦР сразу или храните при –20 °С.

3. Постановка ПЦР

1. Перед постановкой ПЦР разморозьте образцы кДНК и прогрейте при +60 °С в течение 1 мин. Перемешайте на вортексе и добавьте в ПЦР.
2. Для постановки ПЦР используйте расчет:
2-5 мкл разбавленной кДНК на 25 мкл ПЦР
или
0.5-1 мкл неразбавленной кДНК на 25 мкл ПЦР.