

Информация о продукте

Обратная транскриптаза M-MuLV –RH

Описание продукта

M-MuLV –RH – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Она отличается от M-MuLV дикого типа структурой, каталитическими свойствами и температурным оптимумом активности. Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность, но лишен активности РНКазы Н. M-MuLV –RH проявляет оптимальную активность при 42 °С (активна до 50 °С). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 7 т.о. и включать модифицированные основания.

В набор также входит 5 × ОТ-буфер-mix который содержит все необходимые компоненты для работы ревертазы, кроме праймеров и РНК-матрицы. Состав буфера оптимизирован для проведения эффективной реакции обратной транскрипции с широкого набора РНК-матриц.

Состав набора

Компонент	Кат. # (Количество)	
	R03-10	R03-50
M-MuLV –RH ревертаза, 100 ед. акт./мкл*	1 × 100 мкл (10000 ед. акт.)	2 × 250 мкл (50000 ед. акт.)
5× ОТ-буфер-mix	1 × 1 мл	4 × 1,25 мл

* За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее включение 1 нмоль dTMP в кислотонерастворимый продукт за 10 мин при 37 °С.

Применение

- Синтез первой цепи кДНК для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени;
- Синтез кДНК для клонирования;
- Получение меченых кДНК зондов для микроочипов (microarray);
- Мечение ДНК;

Свойства M-MuLV –RH ревертазы

- Осуществляет синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице (РНК зависима ДНК полимеразы);
- Не обладает активностью РНКазы Н;
- Позволяет синтезировать фрагменты кДНК длиной до 7 т.о.;
- Обеспечивает высокий выход кДНК: при использовании 100 ед. акт. фермента на 1 мкг РНК выход реакции составляет не менее 100 нг первой цепи кДНК;
- Обладает повышенной термостабильностью.
- Содержит ингибитор РНКаз.

Источник

Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. coli*, экспрессирующего делеционный вариант гена, кодирующего M-MuLV ревертазу.

Буфер хранения:

50 mM Трис-НСl, рН 8.0 (при 25 °С), 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) NP-40.

5× ОТ-буфер-mix:

250 mM Трис-НСl, рН 8.3 (при 25 °С), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 2.5 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 50 mM дитиотреитол, стабилизаторы и усилители.

Протокол

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте

http://biolabmix.ru/catalog/biolabmix_description_P7001.pdf

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР)

1. Обратная транскрипция (синтез первой цепи кДНК)

После размораживания компонентов набора перемешайте смеси и сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге. Во время работы храните пробирки во льду.

Примечание: если в 5× ОТ-буфер-mix наблюдается выпадение осадка нагреть раствор до 45-50 °С и перемешать до его растворения. Не допускайте длительной инкубации буфера при комнатной температуре и выше без необходимости. Это может привести к снижению концентрации ДТТ и падению эффективности реакции.

1. Добавьте следующие реагенты в стерильную, свободную от нуклеаз пробирку во льду в следующем порядке:

РНК матрица	суммарная РНК	0,1 нг – 5 мкг
	или поли(А) мРНК	10 пг – 0.5 мкг
	или специфическая РНК	0.01 пг – 0.5 мкг
Праймер	олиго(dT) ₁₆	1 – 3 мкл
	или случайный гексапраймер	1 – 3 мкл
	или ген-специфический	15-20 пмоль
Вода, обработанная ДЭПК		До 12 мкл
	Суммарный объем	12 мкл

2. Аккуратно перемешайте и сбросьте капли центрифугированием.

Прогрейте смесь 2-3 мин при 70 °С для расплавления вторичных структур и поместите пробирку в лёд.

Примечание: данная процедура преимущественно необходима при использовании случайного гексапраймера и/или сильно структурированных или GC-богатых матриц.

3. Добавьте предварительно приготовленную смесь следующего состава:

5× ОТ-буфер-mix	4 мкл
M-MuLV –RH ревертаза (100 ед./мкл)	1 мкл
Вода, обработанная ДЭПК	3 мкл
Суммарный объем	8 мкл

4. Аккуратно перемешайте и сбросьте капли центрифугированием.

5. При использовании олиго(dT)₁₆ или ген-специфического праймера для синтеза кДНК инкубируйте реакционную смесь 60 мин. при 42 °С. В случае использования случайного гексапраймера инкубируйте 10 мин. при 25 °С и затем 60 мин. при 42 °С.

Примечание: если матрица РНК GC-богата или структурирована, реакцию можно проводить при более высокой температуре (45-50 °С).

6. Реакция останавливается нагревом реакционной смеси до 70 °С в течении 10 мин. Продукт реакции обратной транскрипции может напрямую использоваться в ПЦР-амплификации или храниться при -20 °С не менее одной недели. Для более долгого хранения рекомендуется -70 °С.

II. ПЦР-амплификация первой цепи кДНК

Продукт синтеза первой цепи кДНК может напрямую использоваться в стандартной ПЦР или ПЦР в режиме реального времени. Необходимый объем реакционной смеси после обратной транскрипции составляет не более 1/10 от суммарного объема реакционной смеси ПЦР. В норме используется 2 мкл реакционной смеси ОТ в качестве матрицы для последующей ПЦР в объеме 50 мкл. Для амплификации фрагмента до 5 т.о. в стандартной ПЦР можно использовать [БиоМастер HS-Tag ПЦР - Color \(2x\)](#) (МНС10-200, МНС10-1020), [БиоМастер HS-Tag ПЦР \(2x\)](#) (МН10-200, МН10-1020). Для фрагментов более 5 т. н. рекомендуем использовать [БиоМастер LR HS-Tag ПЦР-Color \(2x\)](#) (МНС040-100, МНС040-400) или [БиоМастер LR HS-Tag ПЦР \(2x\)](#) (МН040-100, МН040-400). Для ПЦР-амплификации в режиме реального времени рекомендуем использовать наборы [БиоМастер HS-qPCR \(2x\)](#) (МН020-400, МН020-2040), [БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue \(2x\)](#) (МНС030-400, МНС030-2040).

Оптимизация условий реакции

1. В случае необходимости объем реакции можно варьировать от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяя количество всех компонентов.

2. Чем короче фрагмент кДНК, тем меньше фермента необходимо добавлять в реакцию.

Рекомендуемое количество M-MuLV –RN ревертазы на реакцию объемом 20 мкл.

Длина синтезируемой кДНК	Количество РНК матрицы		
	< 500 нг	500 нг – 2 мкг	> 2 мкг
50 – 2000 п.о.	25 – 100 ед. акт.	50 – 100 ед. акт.	200 – 300 ед. акт.
Более 2000 п.о.	50 -100 ед. акт.	100 ед. акт.	200 – 300 ед. акт.

3. Увеличение концентрации РНК матрицы в реакционной смеси приводит к увеличению суммарного выхода смеси

Примечание: если количество РНК матрицы в реакционной смеси более 2 мкг на 20 мкл реакции, для увеличения выхода реакции рекомендуется увеличить не только концентрацию M-MuLV –RN ревертазы, но и концентрацию праймера в 1,5 - 2 раза.

4. Для облегчения прохождения участков матрицы, содержащей GC-богатые участки и участки со сложной вторичной структурой, рекомендуется использовать случайный гексапраймер (Random (dN)₆).

Примечание: в случае сложных матриц температуру можно поднять до 45-47 °С (повышение температуры до 50 °С приведет к снижению выхода реакции, но способствует преодолению структурированных участков).

Хранение и транспортировка: при -20 °С.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 1 год.

Правила и рекомендации

Предотвращение загрязнения рибонуклеазами

Чистота и целостность РНК - это важнейшая характеристика для синтеза полноразмерных кДНК. РНК может быть разрушена РНКазой А, являющейся высокостабильным фактором загрязнения, который может присутствовать в окружающей среде любой лаборатории. Все компоненты набора были тщательно протестированы на отсутствие РНКаз. Для предотвращения загрязнения, как рабочие поверхности стола и приборов, так и используемые растворы должны быть обработаны от РНКаз.

Основные рекомендации для предотвращения загрязнения РНКазами:

- Обработайте ДЭПКом все пробирки и наконечники для пипеток используемые для синтеза кДНК или используйте сертифицированный, свободный от РНКаз пластик.
- Используйте перчатки при обращении с РНК и другими реагентами, так как кожа является известным источником РНКаз. Чаще меняйте перчатки.
- Используйте реагенты свободные от РНКаз, включая высокоочищенную воду (вода, обработанная ДЭПК).
- Используйте ингибитор РНКаз для защиты РНК от активных РНКаз.
- Храните все компоненты набора плотно закрытыми. Во время реакции обратной транскрипции все пробирки должны быть плотно закрыты.

РНК матрица

РНК - важный участник обратной транскрипции и от её качества и количества зависит эффективность процесса. Качество мРНК матрицы определяет объем информации или длину последовательности, которая может быть конвертирована в кДНК посредством обратной транскрипции. Таким образом, важно оптимизировать метод выделения РНК из выбранного биологического источника и предотвращать случайное попадание РНКаз в препарат. Помимо стандартных, лабораторных методов выделения суммарной РНК (например, метод выделения РНК экстракцией смесью фенол-хлороформ), существует ряд коммерчески доступных наборов, однако большинство из них не позволяют выделить РНК, не содержащую следов примесей ДНК, которые могут мешать при дальнейшем анализе с помощью ПЦР. Поэтому, перед использованием РНК в обратной транскрипции рекомендуется провести её обработку ДНКазой I, свободной от РНКаз.

Большинство библиотек кДНК делается из поли(А) селективированных мРНК. Присутствие поли(А) последовательности на 3'-конце мРНК используется для выделения её из суммарной фракции РНК с помощью аффинной хроматографии на олиго(dT) целлюлозе (доля мРНК в суммарной РНК клеток млекопитающих обычно 1-5%). Когда количество источника РНК ограничено и аффинная хроматография не выполнима, возможен эффективный синтез кДНК с нефракционированной мРНК. При анализе экспрессии каждого конкретного гена необходимость фракционирования обуславливается уровнем его экспрессии: если анализируемый ген имеет низкий уровень экспрессии, то для его эффективного обнаружения лучше использовать изолированную фракцию мРНК.

Соблюдайте следующие рекомендации для получения образца РНК высокого качества:

- Исключайте любое попадание РНКаз. Всегда работайте в стерильных условиях, чистых от РНКаз (RNase-free). Обязательно использование всех изделий из стекла, пластика и растворов для выделения и хранения РНК с маркировкой «RNase-free». Проводите предварительную обработку рабочего места с использованием источника УФ-света.
- При выделении и работе с РНК используйте стерильные перчатки.

- На этапах очистки, где отсутствует денатурирующий агент, используйте ингибитор РНКаз. Например, добавьте ингибитор РНКаз в воду, которую планируете использовать для растворения выделенной РНК.
- Используйте для приготовления реакционной смеси и необходимых растворов воду, обработанную диэтилпирикарбонатом.
- Если возможно используйте свежие образцы для выделения РНК.
- Выбирайте метод гомогенизации соответствующий вашему образцу.
- Используйте метод выделения, при котором одновременно лизируются клетки и инактивируются РНКазы (с добавлением SDS или гуанидина).
- Выделенная РНК не должна содержать химических добавок (например, этанол, фенол, SDS, гуанидинизотиоцианат и т.д.), используемых в процессе выделения и способных влиять в дальнейшем использовании.
- Во время проведения эксперимента храните все растворы, содержащие РНК, во льду.
- Перед использованием матрицы осадите РНК, используя этанол, затем промойте осадок 70% этанолом. Убедитесь, что следы этанола удалены перед использованием РНК в реакции обратной транскрипции.
- Кратковременное хранение (несколько часов): храните очищенную РНК от +2 до +8 °С до использования. Долговременное хранение: храните очищенную РНК при -70 °С.

Проверить качество препарата РНК можно следующими методами:

- выделенная фракция мРНК, в 1-2% агарозном геле после электрофореза, должна выглядеть как шмер между 0,5 и 8 т.о. Большинство мРНК должно находиться между 1,5 – 2 т.о.;
- в эукариотической суммарной РНК доминируют рибосомальные РНК, в следствии чего при разгоне в агарозном геле 18S и 28S рРНК должны быть видны как четкие бенды.
- чистоту РНК можно оценить спектрофотометрическим методом: соотношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$) чистого препарата РНК равно 1,9 – 2,0, при рН 7 – 8. В случае присутствия примесей белков или других органических молекул (например, фенола) соотношение уменьшается. При более кислых рН, например, в воде, величина $A_{260/280}$ также уменьшается.

Выбор праймера для синтеза первой цепи кДНК

Праймер, используемый для обратной транскрипции, определяет не только размер получаемой кДНК, но и специфичность реакции. В основном для синтеза первой цепи кДНК выделяют три типа праймеров: олиго(dT)₁₂₋₃₀, случайный праймер или ген-специфический праймер.

Основные типы праймеров для ОТ-ПЦР.

Неспецифические праймеры

Как ранее упоминалось, многие мРНК эукариот имеют на 3'-концах поли(А) последовательность, поэтому для получения полноразмерных копий кДНК с таких РНК используют праймер олиго(dT)₁₂₋₁₈. Для синтеза кДНК праймер олиго(dT)₁₂₋₁₈ берётся в молярном избытке относительно 3'-поли(А) концов мРНК. При получении библиотек кДНК часто используют разновидность олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймера – якорный олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймер. Он отличается от исходного олиго(dT)₁₂₋₁₈ наличием двух случайных оснований на 3'-конце, что обеспечивает синтез кДНК с самого начала поли(А) конца. В силу относительно низкой стабильности РНК в растворах и проявлением рядом ревертаз активности РНКазы Н в таких библиотеках наибольшую представленность имеют 3'-концы мРНК.

Для более равномерной представленности всех последовательностей РНК используют случайный гексапраймер взамен олиго(dT)₁₂₋₁₈ или как дополнение к олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймеру. При использовании случайного гексапраймера формирование комплементарных комплексов для начала синтеза кДНК более равномерно распределено по всей длине мРНК молекулы. Однако некоторые последовательности соответствующие 3'-концам мРНК могут быть потеряны в результате особенностей локализации случайного гексапраймера. В дополнение стоит отметить, что случайный гексапраймер обычно используют не только при получении копий мРНК без поли(А) конца, но и всех других классов РНК. Соотношение количества случайного гексапраймера и РНК является важным параметром при синтезе кДНК и влияет на баланс между средней длиной и количеством получаемого кДНК продукта. Например, в случае SuperScript II 10 праймеров на молекулу мРНК дают приемлемый выход без потери в длине продукта.

Подбор сайт-специфичного праймера

Аmplификация в ОТ-ПЦР специфических РНК последовательностей требует два ПЦР праймера, специфичных к этой последовательности. При подборе таких праймеров необходимо учитывать, что такая пара должна позволять дискриминировать продукт амплификации с кДНК и продукт амплификации с геномной ДНК. Которая может присутствовать в качестве контаминации. Существует два подхода при выборе таких праймеров:

1. Выбирают праймеры отжигающиеся на последовательности экзона, фланкирующих интрон: любой продукт амплификации с геномной ДНК будет гораздо длиннее, чем продукт амплификации с кДНК.
2. Выбирают праймеры, частично специфичные к обоим эксонам в областях, граничащих с началом и концом интрона: геномная ДНК не амплифицируется.