



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Набор реактивов ОТ M-MuLV-RH

Кат. номер R01-50, R01-250

Описание

Набор реактивов ОТ M-MuLV-RH представляет собой полную систему для эффективного синтеза первой цепи кДНК с мРНК или суммарной РНК матриц. Набор содержит все необходимые компоненты для проведения обратной транскрипции: M-MuLV -RH ревертаза, два варианта 5× ОТ-буфера, смесь dNTP, раствор ДТТ, растворы олиго(dT)₁₆ праймера и случайного гексапраймера, а также свободную от РНКаз воду.

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 H. 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.

Набор содержит два типа буфера на основе KCl и (NH₄)₂SO₄, оптимизированные для проведения эффективной реакции обратной транскрипции с любых матриц РНК.

Олиго(dT)₁₆ праймер и случайный гексапраймер позволяют более нацелено подходить к обратной транскрипции интересующих типов или участков РНК. Случайный гексапраймер неспецифически связывается с РНК матрицей и используется для синтеза кДНК со всех типов РНК в суммарной РНК. Олиго(dT)₁₆ праймер селективно отжигается на 3'-поли(А) концах РНК, обеспечивая синтез кДНК только с мРНК содержащих поли(А) конец. Также может быть использован ген-специфичный праймер для синтеза определённой последовательности.

Состав набора

Компонент	Каталожный номер (количество)	
	R01-50 (50 реакций)	R01-250 (250 реакций)
M-MuLV -RH ревертаза, 100 ед. акт./мкл*	1 × 50 мкл (5000 ед. акт.)	1 × 250 мкл (25000 ед. акт.)
5× ОТ-буфер (KCl)	1 × 220 мкл	3 × 400 мкл
5× ОТ-буфер ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1 × 220 мкл	3 × 400 мкл
20× смесь dNTP (10 мМ каждого)	1 × 120 мкл	2 × 300 мкл
Дитиотреитол, 0.1 М	1 × 110 мкл	2 × 260 мкл
Случайный гексапраймер, 20 мкМ	1 × 50 мкл	1 × 260 мкл
Олиго(dT) праймер, 20 мкМ	1 × 50 мкл	1 × 260 мкл
Вода, обработанная ДЭПК	3 × 0,6 мл	5 × 1,8 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 микрочипов (microarray);
- мечение ДНК.

Свойства M-MuLV –RH ревертазы

- Осуществляет синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице (РНК зависимая ДНК полимераза).
- 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 M-MuLV ревертазы.

Буфер хранения

50 мМ Трис-НСl, рН 8,0 (при 25 °С), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0,1 % (v/v) NP-40.

5× ОТ-буфер (KCl)

250 мМ Трис-НСl, рН 8,3 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, стабилизаторы.

5× ОТ-буфер ((NH₄)₂SO₄)

250 мМ Трис-НСl, рН 8,5 (при 25 °С), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 20 мМ MgCl₂, стабилизаторы.

Протокол

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте <http://biolabmix.ru/catalog>

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР)

1. Обратная транскрипция (синтез первой цепи кДНК)

После размораживания компонентов набора перемешать смеси и сбросить капли со стенок на микроцентрифуге. Во время работы хранить пробирки во льду.

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

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

2. Аккуратно перемешать и сбросить капли центрифугированием. Прогреть смесь 2–3 мин при 70 °С для расплавления вторичных структур и поместить 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× реакционный буфер	4 мкл
0,1М ДТТ	2 мкл
10 мМ смесь dNTP	1 мкл
M-MuLV-RH ревертаза (100 ед./мкл)	1 мкл
Суммарный объем	8 мкл

Примечание: для предотвращения возможной деградации РНК рекомендуем добавить в реакцию ингибитор РНКаз (кат. № RI-0020 или RI-0100)

4. Аккуратно перемешать и сбросить капли центрифугированием.
5. При использовании олиго(dT)₁₆ или ген-специфического праймера для синтеза кДНК инкубировать реакционную смесь 30 мин при 42 °С. В случае использования случайного гексапраймера инкубировать 10 мин при 25 °С и затем 30 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 течение 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-Taq ПЦР - Color (2×) (MHC10-200, MHC10-1020), БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (MH10-200, MH10-1020). Для фрагментов более 5 т. н. рекомендуем использовать БиоМастер LR HS-Taq ПЦР-Color (2×) (MHC040-100, MHC040-400) или БиоМастер LR HS-Taq ПЦР (2×) (MH040-100, MH040-400). Для ПЦР-амплификации в режиме реального времени

рекомендуем использовать наборы БиоМастер HS-qPCR (2×) (МН020-400, МН020-2040), БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (МНС030-400, МНС030-2040).

Оптимизация условий реакции

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

Рекомендуемое количество M-MuLV-RH 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.

2. 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-RH ревертазы, но и концентрацию праймера в 1,5 - 2 раза.

3. В случае сложных матриц температуру можно поднять до 45-47 °С (повышение температуры до 50°С может привести к снижению выхода реакции).

Условия хранения:

Хранить при температуре -20°С – 1 год; Не более 30 циклов замораживания-размораживания.

Фермент устойчив к инкубации при комнатной температуре (до 7 дней).

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.