

- 1967.0050** Набор реактивов для обратной транскрипции с MMLV-RH, 50 реакций, Диаэм
1967.0250 Набор реактивов для обратной транскрипции с MMLV-RH, 250 реакций, Диаэм

Описание продукта

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

MMLV–RH – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Она отличается от обратной транскриптазы MMLV дикого типа структурой, каталитическими свойствами и температурным оптимумом активности. Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность, но лишен активности РНКазы Н. **MMLV–RH** проявляет оптимальную активность при +42°C (активна до +50°C). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 10 т.н. и включать модифицированные основания.

Кроме обратной транскриптазы, набор содержит два типа буфера на основе KCl и (NH₄)₂SO₄, оптимизированные для проведения эффективной реакции обратной транскрипции с любых матриц РНК, в том числе содержащих участки повышенной сложности (сильно структурированные или GC-богатые).

Олиго(dT)₁₆ праймер и случайный гексапраймер позволяют более узконаправленно 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 составе суммарной РНК. Олиго(dT)₁₆ праймер селективно отжигается на полиадениновых последовательностях РНК, обеспечивая синтез кДНК только с мРНК, содержащих поли(А)-3'-конец. Также можно использовать специфичные праймеры для синтеза определённой последовательности.

Состав набора

Компонент	Кат. #	
	1967.0050	1959.0250
MMLV-RH ревертаза, 100 ед. акт./ мкл*	1 × 50 мкл (5000 ед. акт.)	2 × 250 мкл (25000 ед. акт.)
5× ОТ-буфер (KCl)	1 × 220 мкл	3 × 400 мкл
5× ОТ-буфер ((NH₄)₂SO₄)	1 × 220 мкл	3 × 400 мкл
20× смесь dNTP (10 мМ каждого)	1 × 120 мкл	2 × 300 мкл
Дитиотреитол	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 × 600 мкл	5 × 1.8 мл
--------------------------------	-------------	------------

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

Источник

Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. coli*, содержащего делеционный вариант гена обратной транскриптазы MMLV.

Буфер для 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.

Область применения:

- 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.
- Анализ РНК с помощью праймер-экстеншн.

Хранение и транспортировка:

при -20°С; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Протокол выполнения обратной транскрипции (синтез первой цепи кДНК)

1. Разморозьте компоненты набора и тщательно перемешайте на вортексе (кроме MMLV ревертазы). Сбросьте капли со стенок пробирок, используя микроцентрифугу. В процессе работы рекомендуется хранить пробирки во льду или термоштативе, охлажденном до 0 - +4°С.

2. Приготовьте реакционную смесь, добавляя реагенты в стерильную, свободную от нуклеаз пробирку во льду в следующем порядке:

РНК-матрица	суммарная РНК	100 пг – 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

3. Аккуратно перемешайте и сбросьте капли центрифугированием.

4. Если РНК-матрица содержит GC-богатые области или вторичные структуры, рекомендуется инкубировать смесь 2 мин при +70°C и поместить пробирку в лёд.

5. Добавьте к смеси «РНК-праймер» оставшиеся компоненты реакции в следующем порядке:

5× реакционный буфер	4 мкл
0,1 М ДТТ	2 мкл
10 мМ смесь dNTP	1 мкл
MMLV–RN ревертаза (100 ед./мкл)	1 мкл

Суммарный объём реакционной смеси должен быть равен 20 мкл.

Примечание: для предотвращения возможной деградации РНК рекомендуем добавить в реакцию ингибитор РНКаз (например, RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen #10777019).

4. Тщательно и аккуратно перемешайте пипетированием и сбросьте капли центрифугированием.

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

Примечание: если матрица РНК является GC-богатой или содержащей вторичные структуры, реакцию можно проводить при более высокой температуре (+45 - +50°C).

6. Реакция останавливается нагревом реакционной смеси до +70°C в течении 10 мин.

Продукт реакции обратной транскрипции может храниться при -20°C не менее одной недели. Для более долгого хранения рекомендуется -70°C и ниже.

Продукт синтеза первой цепи кДНК может напрямую использоваться в стандартной ПЦР или ПЦР в режиме реального времени. Для постановки ПЦР необходимый объём реакционной смеси после обратной транскрипции составляет не более 1/10 от суммарного объёма реакционной смеси ПЦР. В стандартных случаях используется 2 мкл реакционной смеси ОТ в качестве матрицы для последующей ПЦР в объёме 50 мкл. Для амплификации фрагмента до 5 т.п.н. в стандартной ПЦР можно использовать экстра-миксы **HS-Taq ПЦР** (1960.0200, 1960.1020) или **HS-Taq ПЦР - Color** (1961.0200, 1961.1020). Для фрагментов более 5 т.п. н. рекомендуется использовать экстра-миксы **LR Taq ПЦР** или **LR Taq ПЦР-Color** (3339.0200, 3339.1020). Для ПЦР в режиме реального времени рекомендуем использовать наборы **HS-qPCR** (1979.0200, 1979.1020) или **HS-qPCR SYBR Blue** (1974.0200, 1974.1020)