



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

Обратная транскриптаза M-MuLV-RH

Кат. номер R03-10, R03-50

Описание

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°C (активна до 50 °C). 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	Каталожный номер (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 °C.

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, кодирующего M-MuLV ревертазу.

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-mix

250 мМ Трис-НСl, рН 8,3 (при 25 °С), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 2,5 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 50 мМ дитиотриэтол, стабилизаторы и усилители.

Протокол

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

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.

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. Добавить 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) ₁₈	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 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. Добавить предварительно приготовленную смесь следующего состава:

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

4. Аккуратно перемешать и сбросить капли центрифугированием.
5. При использовании олиго(dT)₁₆ или ген-специфического праймера для синтеза кДНК инкубировать реакцию смесь 60 мин. при 42 °С. В случае использования случайного гексапраймера инкубировать 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-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×) (MH020-400, MH020-2040), БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (MHC030-400, MHC030-2040).

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-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.

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. 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).

Условия хранения

Хранить при -20 °С – 1 год; не более 30 циклов замораживания-размораживания. Фермент устойчив к инкубации при комнатной температуре (до 7 дней).

Условия транспортировки

Транспортируется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.