

Обратная транскриптаза MMLV

Кат.# SK022

Обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей (MMLV ревертаза) предназначена для синтеза первой цепи кДНК с одноцепочечной РНК-матрицы. Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. coli*, экспрессирующего ген MMLV ревертазы дикого типа.

Свойства MMLV ревертазы

- Осуществляет синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице (РНК зависимая ДНК полимеразы).
- Обладает слабой активностью РНКазы Н.
- Позволяет синтезировать фрагменты кДНК длиной до 5 т.п.о.
- Обеспечивает высокий выход кДНК: при использовании 100 ед. фермента на 1 мкг РНК выход реакции составляет не менее 100 нг первой цепи кДНК.

Область применения

- Синтез первой цепи кДНК для последующей амплификации, в том числе в режиме «реального времени»
- Включение в цепь кДНК модифицированных нуклеотидов (приготовление меченных зондов)
- ОТ-ПЦР «в одной пробирке» (обратная транскрипция-ПЦР)
- ▶ *Входящий в комплект 5x буфер для синтеза первой цепи кДНК не предназначен для реакции ОТ-ПЦР «в одной пробирке». Для этого приложения используйте протоколы и специализированный реакционный буфер для ОТ-ПЦР.*

Состав и условия хранения

Набор рассчитан на 100 реакций (объем 20 мкл).

Компоненты набора*	Кол-во
MMLV ревертаза, (MMLV RT, 100 ед/мкл)	100 мкл (10000 ед.)
5x буфер для синтеза первой цепи (5X first strand buffer) (280 мМ Трис-НСl, рН 8.7; 375 мМ КСl; 30 мМ MgCl ₂)	1.8 мл
DTT (20 мМ)	1.0 мл
Буфер для разведения MMLV ревертазы (MMLV RT storage buffer) (50 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 300 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 мМ DTT; 50% глицерин; 0.01% Triton X-100)	500 мкл

* Пробирки, содержащие указанные компоненты, подписаны по-английски; английские названия даны в скобках.

Хранение и транспортировка: -20°C

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

Оптимальные условия реакции синтеза первой цепи кДНК

- Температура: 37-42°C
- Время инкубации: 30-60 мин
- Рекомендуемое количество РНК-матрицы (поли(А)+ или тотальная РНК): 100 нг-2 мкг на 20 мкл реакционной смеси
- Рекомендуемое количество MMLV ревертазы на 20 мкл реакции: 50-100 ед.

Протокол синтеза первой цепи кДНК

► **Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!**

1. Приготовьте смесь следующих компонентов в стерильной пробирке:

Х мкл Стерильная вода, свободная от РНКаз

1-6 мкл РНК матрица (0.5-2 мкг)

1-3 мкл праймер (20 мкМ)

9 мкл Суммарный объем первой части реакционной смеси

2. Аккуратно перемешайте смесь, сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге.
 3. Прогрейте смесь 2 мин при 70°C для расплавления вторичных структур РНК и перенесите образцы в лед. Сбросьте капли реакционной смеси со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 4. Добавьте 11 мкл предварительно подготовленной смеси следующего состава:
 - X мкл Стерильная вода, свободная от РНКаз
 - 4 мкл 5x буфер для синтеза первой цепи
 - 2 мкл смесь dNTP (10 мМ каждого)
 - 2 мкл DTT (20 мМ)
 - 1-3 мкл MMLV ревертаза (добавить в последнюю очередь!)

 - 11 мкл Суммарный объем второй части реакционной смеси
- ▶ Для предотвращения возможной деградации проб рекомендуется добавить в реакцию ингибитор РНКаз (например, RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega; SUPERase-IN, Ambion).
- ▶ При использовании MMLV ревертазы в количестве менее 100 ед. на реакцию, рекомендуется развести фермент до нужной концентрации буфером для разведения так, чтобы на реакцию требовалось не менее 1 мкл раствора фермента. Это позволит избежать ошибок при отборе аликвот.
5. Аккуратно перемешайте смесь, сбросьте капли со стенок на микроцентрифуге.
 6. Инкубируйте реакционную смесь 30-60 мин при 37-42°C.
 - ▶ Реакцию следует проводить в амплификаторе с греющейся крышкой или в сухом термостате. В последнем случае наложите поверх реакционной смеси 1 каплю (15-20 мкл) минерального масла, чтобы объем реакции не изменился из-за испарения.

7. Для остановки реакции прогрейте смесь при 70°C в течение 10 мин.

Образец первой цепи кДНК может храниться до 3-х месяцев при -20°C или в течение года при -70°C. Многократное размораживание-замораживание образца может привести к его деградации. Поэтому мы рекомендуем разделить образец на аликвоты перед первым замораживанием.

Перед использованием аликвоту рекомендуется прогреть 2 мин при 65°C (для дезагрегации молекул кДНК), встряхнуть и собрать капли центрифугированием.

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус 70
(Технопарк ИБХ)
Тел.: +7(495)988-4083
Факс: +7(495)988-4085
www.evrogen.ru