



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 RNAscribe RT

Кат. номер R04-10, R04-50

Описание:

RNAscribe RT – 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 и проявляет оптимальную активность при 55°C (активна до 65°C). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 9 т.о. и включать модифицированные основания. Его быстрая скорость реакции позволяет выполнять синтез всего за 15 минут, а высокая рабочая температура фермента (до 65°C) позволяет использовать сложные матрицы и обеспечивает специфичность реакции.

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.

Формат набора обеспечивает гибкость при постановке реакции и позволяет проводить предварительную инкубацию РНК с праймерами.

Состав набора

Компонент	Каталожный номер (количество)	
	R04-10	R04-50
RNAscribe RT 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
Праймер-Микс	1 × 0,2 мл	2 × 0,5 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;
- Синтез кДНК сложных и длинных матриц;
- Получение меченых кДНК зондов для микрочипов (microarray);
- Мечение ДНК.

Свойства RNAscribe RT ревертазы

- Осуществляет синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице (РНК зависящая ДНК полимераз);
- Подавлена активность РНКазы H;
- Позволяет синтезировать фрагменты кДНК длиной до 9 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*, содержащего плазмиду с высокоэкспрессирующим геном ревертазы RNAscribe RT.

Буфер хранения:

50 mM Трис-HCl, pH 8.0 (при 25 °C), 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-HCl, pH 8.3 (при 25 °C), 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>

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР)

I 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°C и перемешать до его растворения.

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	Праймер-микс	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°C для расплавления вторичных структур и поместить пробирку в лёд.

Примечание: данная процедура не является необходимой, но желательна 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
RNAscribe RT 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 реакционную смесь 30-50 мин. при 55°C. В случае использования случайного гексапраймера или Праймер-микс рекомендуем добавить инкубацию 10 мин. при 25°C и затем 30-50 мин. при 55°C.
Примечание: если матрица РНК GC-богата или структурирована, реакцию можно проводить при более высокой температуре (до 65°C).
6. Реакция останавливается нагревом реакционной смеси до 85°C в течении 5 мин.

Продукт реакции обратной транскрипции может напрямую использоваться в ПЦР-амплификации или храниться при -20°C не менее одной недели. Для более долгого хранения рекомендуется -70°C.

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×) (МНС10-200, МНС10-1020), БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (МН10-200, МН10-1020). Для фрагментов более 5 т. н. рекомендуем использовать БиоМастер LR HS-Taq ПЦР-Color (2×) (МНС040-100, МНС040-400) или БиоМастер LR HS-Taq ПЦР (2×) (МН040-100, МН040-400). 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. 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 RNAscribe RT ревертазы на реакцию объемом 20 мкл.

Длина синтезируемой кДНК	Количество РНК матрицы	
	< 1 нг	500 нг – 2 мкг
100 – 2000 п.о.	25 – 100 ед. акт.	75 – 150 ед. акт.
Более 2000 п.о.	100 – 150 ед. акт.	100 – 250 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 55–60°C (повышение температуры до 65°C приведет к снижению выхода реакции, но способствует преодолению структурированных участков).

Условия хранения:

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

Условия транспортировки:

В термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.