

ArtMMLV ревертаза с буфером

Методические указания по применению

Каталожный №	Комплектация
256026	– ArtMMLV ревертаза (200 ед/мкл), 0,1 мл; – 10-кратный буфер «ТГ», 1,25 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 1,25 мл
256027	– ArtMMLV ревертаза (200 ед/мкл), 1 мл; – 10-кратный буфер «ТГ», 12,5 мл; – 50 мМ MgCl ₂ , 12,5 мл

1. Описание

ArtMMLV ревертаза представляет собой генетически модифицированную обратную транскриптазу вируса мышиной лейкемии Молони (MMLV), осуществляющую синтез комплементарной цепи ДНК (кДНК) на матрице одноцепочечной РНК. Благодаря наличию нескольких мутаций у фермента подавлена активность РНКазы Н и повышена термостабильность (оптимальная температура для работы фермента – 50 °С, фермент сохраняет активность при температуре до 65 °С).

По сравнению с MMLV дикого типа ArtMMLV ревертаза обеспечивает более высокий выход кДНК, позволяет амплифицировать более длинные фрагменты (до 12 000 п.о.), имеет улучшенную эффективность при использовании GC-богатых РНК-матриц, а также более высокую продуктивность.

Для удобства пользователей ArtMMLV ревертаза выпускается в нескольких комплектациях: как самостоятельный реагент либо в комплекте с 10-кратным буфером, состав которого оптимизирован для проведения ОТ-ПЦР, а также раствором 50 мМ MgCl₂ для оптимизации условий амплификации.

2. Область применения

- Синтез первой цепи кДНК;
- Анализ РНК при помощи удлинения праймеров;

- Создание библиотек кДНК;
- ОТ-ПЦР;
- Включение в цепь кДНК меченных нуклеотидов.

3. Синтез кДНК с использованием ArtMMLV ревертазы

Для уменьшения ошибки пипетирования при постановке нескольких параллельных реакций рекомендуется приготовить общий премикс, содержащий все компоненты смеси (воду, дНТФ, буфер, MgCl₂, ревертазу, праймеры) за исключением РНК-матрицы. Объем премикса рассчитывается исходя из числа реакций с добавлением одного дополнительного образца. После того, как аликвоты премикса будут внесены в предварительно промаркированные ПЦР-пробирки, в них добавляют соответствующую РНК-матрицу.

1. Перед использованием разморозить и тщательно перемешать все компоненты реакционной смеси.

2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 1. Количество вносимых компонентов приведено для одной реакции объемом 25 мкл.

Таблица 1. Состав реакционной смеси объемом 25 мкл

Компонент	Объем	Конечная конц.
10-кратный буфер «ТГ»	2,5 мкл	1-кратный
Смесь дНТФ (каждый в концентрации 25 мМ)	0,5 мкл	0,5 мМ
MgCl ₂ (50 мМ)	1,5 мкл	3 мМ
Олиго(дТ) ₁₂₋₂₅ (50 мкМ) или Random праймеры (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
РНК-матрица	Определяется пользователем	0,04 пг/мкл – 200 нг/мкл
ArtMMLV ревертаза (200 ед/мкл)	0,2–1 мкл	1,6–8 ед./мкл
H ₂ O	Довести объем реакционной смеси до 25 мкл	

В зависимости от особенностей используемой матрицы и задач исследования, состав реакционной смеси может быть оптимизирован:

- оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,04–1 мкМ;
- на одну реакцию объемом 25 мкл рекомендуется использовать 1 пг – 5 мкг общей РНК или 10 пг – 500 нг мРНК;

- концентрацию ArtMMLV ревертазы можно варьировать в пределах 25–200 ед. на реакцию (объемом 25 мкл).

Допускается использование праймеров с другой начальной концентрацией.

Для предотвращения возможной деградации проб рекомендуется использовать стерильную воду, свободную от РНКаз (например, обработанную диэтилпиокарбонатом (DEPC)).

При необходимости объем реакционной смеси может быть изменен с сохранением конечной концентрации входящих в нее компонентов.

3. Аккуратно перемешать реакционную смесь и осадить капли со стенок пробирки.

4. Провести реакцию обратной транскрипции, согласно таблице 2.

Таблица 2. Стандартные условия проведения реакции обратной транскрипции

Этап	Температура	Время
Ревертгирование	25 °С	10 мин
	50–55 °С	15–60 мин
Инактивация ревертазы	85 °С	5 мин
Хранение	4 °С	∞

Для последующего анализа кДНК с применением ПЦР-РВ рекомендуется использовать не более 2 мкл полученного образца на реакцию амплификации объемом 25 мкл.

Образец первой цепи кДНК может храниться не менее месяца при температуре –20 °С. Более длительное хранение осуществляется при температуре –70 °С.

4. Условия хранения и транспортировки Буфер для хранения и разведения:

25 мМ Трис-НСl (рН 7,5); 100 мМ КСl; 50 % глицерин; 0,05 % Tween-20; 200 мкг/мл поли(А).

Транспортирование ArtMMLV ревертазы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37 °С (до 5 суток) или при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

ArtMMLV ревертаза хранится при температуре от –16 °С до –24 °С.

Срок годности – 1 год.