

M-MLV Reverzní transkriptáza

KLÍČOVÉ REAGENS PRO REVERZNÍ TRANSKRIPCI mRNA NA cDNA
(katalogové číslo M023, M024)

rev. 01/2022

Popis

Jedná se o rekombinantní reverzní transkriptázu (RT) myšího leukemického viru Moloney. Reverzní transkriptázy jsou enzymy, které mají schopnost syntetizovat DNA na základě RNA a oligonukleotidového očka.

Technické údaje

Koncentrace

- M-MLV Reverzní transkriptáza je dodávána v koncentraci 200 U/μl.

Balení

- 1 zkumavka s M-MLV reverzní transkriptázou: 2000 U/10 μl.
- 1 zkumavka 5x koncentrovaného M-MLV reakčního pufru o objemu 200 μl.
- 1 zkumavka 100 mM dithiothreitol (DTT) o objemu 100 μl.

Definice jednotky

- Jedna jednotka M-MLV RT je definována jako množství enzymu, které inkorporuje 1 nmol dTTP do materiálu precipitovatelného TCA za 10 min při 37°C. Jako templát je použit poly(A)-oligo (dT)₁₂₋₁₈.

Skladování

- Skladovat při teplotě -20 ± 5°C.

Čistota

- Preparát je prostý nukleáz a má odpovídající parametry z hlediska čistoty a výtěžnosti cDNA produktu.

Složení

- Skladovací pufr: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% Nonidet P-40, 50% (vol/vol) glycerol.
- 5x reakční pufr (1. řetězec): 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, stabilizátor.

Protokol

Doporučený protokol pro přípravu cDNA (první řetězec)

1. V tenkostěnné zkumavce pro PCR smíchat jednotlivé komponenty:

- 4 μl PCR H₂O.
- 1 μl RNA o koncentraci 1 mg/ml. Při odchylné koncentraci RNA upravit odpovídajícím způsobem množství vody a RNA tak, aby konečný objem byl 5 μl.
- 0,5 μl oligo dT₁₂₋₁₈ primer, nebo jiný primer (50 μM).
- 0,5 μl 10 mM dNTP Mix (každý z nukleotidů v koncentraci 10 mM).

2. Krátce stočit, inkubovat 5 min při 65°C, rychle ochladit na ledu a přidat:

- 2 μl 5x koncentrovaného M-MLV reakčního pufru.
- 1 μl 100 mM DTT.
- 1 μl (25 U) M-MLV RT (po naředění zásobního roztoku M-MLV (1:8) v 1x M-MLV reakčním pufru).

3. Inkubovat 1 hod při 37°C.

4. Zahřát zkumavku na 80°C po 15 min; tím dojde k denuraci M-MLV-RT.

Finální koncentrace jsou: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dTTP, 0,5 mM dCTP, 2,5 μM oligo dT₁₂₋₁₈ (nebo jiný) primer, 100 μg RNA/ml, 2500 U M-MLV-RT/ml.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
M023	M-MLV reverzní transkriptáza	2 000 U
M024	M-MLV reverzní transkriptáza	5x 2 000 U

