



# Инструкция по применению

## Genta-RT kit

Набор для синтеза первой цепи кДНК

Версия 1 от 27.04.2023

### 1. ОПИСАНИЕ

Genta-RT kit представляет собой набор реагентов для проведения синтеза первой цепи кДНК на матрице РНК. Набор включает в себя: *in silico* модифицированный гомолог обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV) – Genta REV M ревертазу; Олиго(dT)<sub>18</sub> праймер; воду для ПЦР и 2 вида 5-кратного реакционного буфера (включающего в себя дНТФ и ДТТ):

5x Genta ОТ-буфер R – наличие Random-праймеров в реакционном буфере позволяет проводить синтез тотальной кДНК.

5x Genta ОТ-буфер – требуется добавление специфических праймеров для синтеза целевого фрагмента кДНК; или добавление Олиго(dT)<sub>18</sub> праймера для полиаденилированной РНК.

В состав набора входит генетически модифицированная обратная транскриптаза вируса мышиной лейкемии Молони (MMLV), которая по сравнению с обратной транскриптазой «дикого типа» обладает повышенной термостабильностью: оптимальная температура для работы фермента — 50°C, фермент сохраняет активность при температуре до 65°C. Термическая инактивация фермента происходит при прогревании фермента до 85°C в течение 20 минут.

Набор рассчитан на проведение не менее 100 реакций объемом 20 мкл.

### 2. СОСТАВ

| Артикул | Наименование | Компоненты                           |             |
|---------|--------------|--------------------------------------|-------------|
| GRT-kit | Genta-RT kit | Genta REV M ревертаза, 25 000 ед./мл | 1 x 0,2 мл  |
|         |              | 5x Genta ОТ-буфер R                  | 1 x 0,5 мл  |
|         |              | 5x Genta ОТ-буфер                    | 1 x 0,5 мл  |
|         |              | Олиго (dT) <sub>18</sub> , 50 мкМ    | 1 x 0,1 мл  |
|         |              | Вода для ПЦР                         | 2 x 1,25 мл |



### 3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Синтез кДНК
- Вставка меченых нуклеотидов в кДНК

### 4. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ. СИНТЕЗ ПЕРВОЙ ЦЕПИ кДНК

1. Состав реакционной смеси:

| Компонент                                    | На 20 мкл реакции |
|--|-------------------|
| Genta REV M ревертаза                        | 10 – 50 единиц    |
| 5x Genta ОТ-буфер (R)                        | 4 мкл             |
| Олиго (dT) <sub>18</sub> (при необходимости) | 1 мкл             |
| РНК-матрица                                  | 0,5 пг – 2 мкг    |
| Вода для ПЦР                                 | До 20 мкл         |

2. Условия проведения реакции:  
10 мин при 25°C;  
30 – 60 мин при 37 ÷ 50°C;  
20 мин при 85°C (для остановки реакции).
3. Полученный образец кДНК может храниться до 1 месяца при температуре от минус 24°C до минус 16°C или до 12 месяцев при температуре не выше минус 68°C. Не рекомендуется многократно замораживать-размораживать образец кДНК.

### 5. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Температура хранения: - 20°C.

Условия транспортировки: в термоконтейнере с хладоэлементами, при температуре от 2°C до 8°C не более 7 суток.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки: 24 месяца с момента производства.

## СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

✓ **Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность**

Инкубация 200 ед. фермента с 1 мкг лямбда ДНК/Hind III при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимой деградации фрагментов ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **Неспецифическая эндонуклеазная активность**

Инкубация 200 ед. фермента с 0,6 мкг ДНК pBR322 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **РНКазная активность**

Инкубация 200 ед. фермента с 50 нг флуоресцентно меченного РНК-субстрата при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **Чистота белка (SDS-ПААГ)**

Фермент имеет чистоту  $\geq 99\%$ , определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

✓ **Контаминация геномной ДНК *E.coli* (ПЦР-РВ)**

Минимум 200 единиц ревертазы были проверены на наличие геномной ДНК *E.coli* с использованием ПЦР-РВ с флуоресцентным зондом и праймерами, специфичными для локуса 16S рPHK *E.coli*. Контаминация не выявлена.

✓ **Функциональное тестирование**

Синтез фрагментов кДНК разной длины (200 – 1500 н.) на РНК-транскрипте с последующей амплификацией и детекцией продуктов реакции методом агарозного гель-электрофореза.

### ***Уважаемый Пользователь!***

*Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!*

*Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем Вам признательны если вы предоставите на обратную связь по адресу [info@genterra.ru](mailto:info@genterra.ru)*

