

Информация о продукте

БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×)

Описание продукта

БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×) * предназначен для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 7 kb) и сложных матриц одношаговым методом. Набор содержит **2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум**, содержащий все необходимые компоненты (за исключением ферментов, РНК матрицы и праймеров); смесь ферментов **БиоМастер-Премиум-микс**, **Воду, обработанную ДЭПК**, **ДМСО** и **буфер для нанесения (6×)**.

В состав **БиоМастер-Премиум-микс** входит M-MuLV –RH, *HS-Taq* ДНК-полимераза и *Pfu* ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

M-MuLV –RH – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность, но лишен активности РНКазы Н. Ревертаза M-MuLV –RH обладает повышенной термостойкостью и проявляет активность до 50 °С.

Высокоточную ПЦР осуществляет комбинация из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной *HS-Taq* ДНК-полимераза и *Pfu* ДНК-полимеразы с корректирующей активностью. Смесь полимераз неактивна при комнатной температуре. Для активации ферментов необходим прогрев реакционной смеси при 92-93 °С в течение 5 мин.

Сочетание полимераз позволило повысить точность и надежность амплификации в несколько раз по сравнению с *Taq* ДНК-полимеразой. Совместное использование двух ферментов дает возможность нарабатывать ПЦР-продукты до 7 т.п.о. Продукты, полученные с помощью **БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×)**, преимущественно содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

Буфер оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР.

Состав набора

Кат. #	2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум	БиоМастер-Премиум-микс	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК	Буфер для нанесения (6×)
RM05-40	2 × 0.5 мл	1 × 80 мкл	1 × 0,1 мл	2 × 0.5 мл	1 × 0.5 мл
RM05-200	4 × 1.25 мл	1 × 0,4 мл	1 × 0,2 мл	3 × 1.8 мл	1 × 1 мл

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.3 (при 25 °С), 150 мМ КСl, 0,6 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 6 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ стабилизаторы и усилители ферментов.

Состав БиоМастер-Премиум-микс:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.0 (при 25 °С), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) NP-40, ингибитор РНКаз, M-MuLV –RH ревертаза, *HS-Taq* ДНК-полимераза и *Pfu* ДНК-полимераза.

Применение

- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая высокоточная ОТ-ПЦР
- Нарботка продуктов для клонирования

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RH ревертазы, *HS-Taq* и *Pfu* ДНК-полимераз;
- Обеспечивает длительное хранение (хранение **БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×)** в течение 2 дней при комнатной температуре и многократное замораживание-размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР);

Преимущества использования

- Высокая специфичность;
- Высокая точность ПЦР (выше, чем у *Taq* ДНК-полимеразы)
- Высокая чувствительность;
- Низкая ошибка пипетирования и вероятности кросс-контаминации;
- Позволяет стандартизовать условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах);
- Возможность ТА клонирования продуктов ПЦР за счет выступающих на концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков.

Ограничения к использованию

- Не рекомендуется использовать для праймеров с неполной комплементарностью

Протокол

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте <http://biolabmix.ru/catalog/RMC02.pdf>

1. Разморозить **2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум** и тщательно перемешать.
2. Поместить тонкостенные пробирки для ПЦР в лед и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
2× смесь для ОТ-ПЦР–Премиум	25 мкл	1×
БиоМастер-Премиум-микс	2 мкл	
Прямой праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
РНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 50 мкл	

Примечание: в случае амплификации матриц, имеющих сложную пространственную структуру, допускается добавление ДМСО от 1 до 5% от конечного объема реакционной смеси. При этом учитывайте изменение T_m праймеров при составлении программы.

Примечание: в зависимости от копийности и сложности гена добавляемый объем БиоМастер-Премиум-микс может варьироваться от 1 до 3 мкл на реакцию объемом 50 мкл.

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.
Примечание: в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте

в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	30 мин	1
Предварительная денатурация	92-93	5 мин	1
Денатурация	93	5 – 15 сек	25 - 50
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	10 - 20 сек	
Элонгация	68	0,5 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	68	5 – 15 мин	1

Tm - температура плавления дуплекса матрица/праймер, определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом.

Примечание: для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1хТАЕ буфер с бромистым этидием.

Примечание: Подвижность красителей в 0,5 – 1,5% агарозном геле

Ксилен цианол	Бромфеноловый синий	Orange G	Тартразин
10000 – 4000 п.о.	500-400 п.о.	<100 п.о.	<20 п.о.

Оптимизация условий реакции

1. В случае необходимости, объем реакции можно варьировать от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяя количество всех компонентов.
2. Для облегчения прохождения участков матрицы, содержащей GC-богатые участки и участки со сложной вторичной структурой, возможно увеличить температуру до 50 °С и/или добавить реагенты, способствующие расплавлению вторичной структуры нуклеиновых кислот (например, ДМСО).

Хранение: при +4 °С - 1 месяц; при -20 °С – 1 год, не более 30 циклов замораживания-размораживания.

Транспортировка: в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Т/ф (383) 363-51-91
<http://www.biolabmix.ru>