



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

Набор праймеров на мРНК НКГ человека

Кат. номер НКГ-Н-010

Описание

«Набор праймеров на мРНК НКГ человека» содержит праймеры на фрагменты шести мРНК генов «домашнего хозяйства» человека для проведения 100 реакций (по 25 мкл) с интеркалирующим красителем SYBR Green I по каждому гену. Все праймеры подобраны так, чтобы устранить прохождение ПЦР с геномной ДНК или дифференцировать значения C_q для ДНК от значений C_q для РНК более чем на 7 (при условии высокой целостности РНК ($RIN \geq 6$)). Эффективность реакции каждой пары праймеров лежит в интервале 100 ± 10 %.

Назначение

Набор предназначен для амплификации фрагментов мРНК генов «домашнего хозяйства» *B2m*, *Pkm*, *Gapdh*, *Hprt*, *HSPA5* и *PPIA Homo Sapiens* в биологическом образце методом одно- или двухшаговой ОТ-ПЦР (обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция) в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Материалом для проведения ПЦР служат пробы суммарной РНК, выделенные из биологического образца одним из коммерчески доступных наборов.

Принцип выбора референсных генов

Гены «домашнего хозяйства» – это гены, которые кодируют белки, связанные с процессами репликации, трансляции, анаболизма и катаболизма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. В научных исследованиях эти гены используют в качестве нормировочных или референсных генов при исследовании изменения экспрессии мРНК других генов.

Получение достоверных и верифицируемых данных оценки относительного изменения экспрессии какого-либо гена на уровне мРНК (методом дельта, дельта C_t или другими методами на его основе) одним из критических параметров является выбор правильных нормирующих генов. Как правило таких генов выбирается несколько (3-4), экспрессия которых (каждого по отдельности или всех в совокупности) изменяется в ходе эксперимента незначительно. Потребность использования нескольких (чем больше, тем лучше) референсных генов определяется фактом, что экспрессия любого гена не является константой и подвержена изменению под действием как внешних (температура, свет, химические воздействия и т.д.), так и внутренних (клеточный цикл и др.) факторов.

Другим немаловажным критерием успеха такого эксперимента является близкая эффективность реакции ОТ-ПЦР для праймеров, участвующих в анализе, во всем аналитическом диапазоне. Особенно это важно, когда нет возможности использовать программы, позволяющие учитывать эффективность ОТ-ПЦР по каждой паре праймеров. Праймеры, предложенные в наборе имеют высокие (100 ± 10 %) и близкие друг к другу эффективности реакций на реактивах компании ООО «Биолабмикс».

Чтобы выбрать референсные гены для конкретно вашего эксперимента получите значения C_q для всех ваших образцов, участвующих в анализе. Обработайте с помощью имеющейся программы или известных вам статистических методов анализа полученные данные. Определите, какие гены из предложенных шести проявляют наибольшую стабильность экспрессии в рамках вашего эксперимента. Проведите оценку изменений экспрессии интересующих (целевых) генов относительно выбранных референсных.

Состав набора

Реагент	Объем	Количество
Микс B2m праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка
Микс Pkm праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка
Микс Gapdh праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка
Микс Hprt праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка
Микс Hspa5 праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка
Микс Ppia праймеры (20×)	150 мкл	1 пробирка

Проведение исследования

Протокол постановки ПЦР

A. Подготовка проб для проведения ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Разморозить пробирки с реагентами БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (RM04-80 или RM04-400), Стерильную воду, Микс праймеры (20×) – каждую пробирку тщательно перемешать на вортексе.
2. В качестве матрицы при постановке отрицательного контроля использовать растворитель, в котором была произведена элюция РНК.
3. Осадить капли жидкости со стенок и крышек пробирок, кратковременно открутив их на микроцентрифуге.
4. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь объемом для необходимого количества образцов (N+1, где N – количество исследуемых образцов с учетом всех контролей).

Контроли этапа ПЦР:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – стерильная вода;
- б) отрицательный контроль выделения (ОКВ) – раствор для элюции РНК, использовавшийся при выделении.

Состав реакционной смеси на 1 пробирку

Компонент	Объем
БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×)	12,5 мкл
БиоМастер-микс (25×)	1 мкл
Микс праймеры (20×)	1,25 мкл
Стерильная вода	0,25 мкл

5. Поместить тонкостенные пробирки на штатив «рабочее место», добавить отдельным наконечником 15 мкл реакционной смеси в каждую. Промаркировать пробирки.

6. Добавить отдельными наконечниками в пробирки с готовой реакционной смесью по 10 мкл (можно брать от 1 до 10 мкл, разницу компенсировать водой) на образец, в пробирки для контролей по 10 мкл соответствующих контролей.
7. Осторожно перемешать без образования пузырей и сбросить капли, используя центрифугу (при этом необходимо использовать специальный ротор для микропробирок).

Б. Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

1. Включить амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить программу.
2. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки реакционного модуля прибора (лунки пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).
3. Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала следуя алгоритму программного обеспечения.

Использовать каналы:

- **SYBR** (длина волны возбуждения флуоресценции составляет 497 нм, длина волны флуоресценции – 521 нм).

Задать следующие параметры эксперимента:

Протокол амплификации

Шаг	Темп-ра, °C	Время инкубации	Кол-во циклов	Измерение флуоресценции*
Обратная транскрипция	45	10 мин	1	-
Активация полимеразы	95	5 мин	1	-
Денатурация	95	10 сек		-
Отжиг	60	10 сек	45	-
Элонгация	72	10 сек		
	78	3 сек		SYBR
Кривая плавления	60 - 95	-	1	SYBR

ВАЖНО! При использовании приборов для амплификации с вертикальным съемом детекции оптического сигнала (например, QuantStudio 5, Applied Biosystems; iCycler iQ5, Bio-Rad и др.) запрещено проводить маркировку на крышке пробирок.

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе.

В. Интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора SYBR регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_q в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения C_t или C_p), сомнительным во всех других случаях.

При анализе Кривой плавления температурой плавления продуктов реакции являются следующие значения:

Целевой ген	Температура плавления продукта, °C
B2m	84,5
Pkm	86,5
Gapdh	88
Hprt	81
Hspa5	80
Ppia	87

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °C - 7 дней; при +4 °C - 4 месяца; при -20 °C - 18 месяцев;
не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

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