

Информация о продукте

БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)

Описание продукта

Набор реагентов **БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)** содержит **2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ**, содержащий все необходимые компоненты (за исключением РНК матрицы и праймеров); **БиоМастер-микс** и **Воду, обработанную ДЭПК**. Набор предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ) с флуоресцентными зондами одношаговым методом.

В состав **БиоМастер-микс** входит M-MuLV –RH и *HS-Taq* 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.

HS-Taq ДНК-полимераза, представляет собой рекомбинантную *Taq* ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. *HS-Taq* ДНК-полимераза неактивна при температуре до 70 °С. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР при короткой 5-и минутной инкубации при 95 °С. Рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной *Taq* ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*. Рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.о.

2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР.

Состав набора

Кат. #	2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ	25× БиоМастер-микс	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
RM03-80	2 × 0.5 мл	1 × 80 мкл	0,2 мл	2 × 0.5 мл	80
RM03-400	4 × 1.25 мл	1 × 400 мкл	0,5 мл	3 × 1.8 мл	400

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ:

100 мМ Трис-НСI, рН 8.3 (при 25 °С), 150 мМ КСI, 0,6 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 10 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ, стабилизаторы и усилители ферментов.

Состав 25× БиоМастер-микс:

50 мМ Трис-НСI, 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 и *HS-Taq* ДНК-полимераза.

Применение

- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RH ревертазы и *HS-Taq* ДНК-полимеразы,
- Обеспечивает длительное хранение (хранение **БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)** в течение 2 дней при комнатной температуре и многократное замораживание-размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР)
- Смесь не содержит красители, что делает её универсальной.

Преимущества использования

- Высокая специфичность;
- Высокая чувствительность;
- Простота и удобство в использовании;
- 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 ампликонов длиной свыше 5 т.п.о.

Протокол

Рекомендуем перед началом работ ознакомиться с правилами и рекомендациями, приведенными в описании к набору на сайте http://biolabmix.ru/catalog/biolabmix_description_P7002.pdf.

1. Разморозить **2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ** и тщательно перемешать.
2. Поместить тонкостенные пробирки для ПЦР в лед и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	12,5 мкл	1×
25× БиоМастер-микс	1 мкл	
Прямой праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Зонд	переменный	0,1 – 300 нМ
РНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 25 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-микс** может варьироваться от 0,5 до 2 мкл на реакцию объемом 25 мкл.

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

4. Проведите ПЦР, используя один из рекомендованных режимов:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10-30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	10 – 20 сек	30 - 50
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	10 - 20 сек	
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	

Либо:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10-30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 сек	30 - 50
Отжиг/элонгация	50 - 68	1 мин	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Хранение: в месте, защищенном от попадания света: при +4 °С – 3 недели; при -20°С – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Транспортировка: при 0 - +4 °С.

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).