



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

ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)

Кат. номер FRM03-80; FRM03-400

Описание:

Реагент ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) разработан для проведения сублимационной сушки (лиофилизации) без дополнительной модификации и предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ) с флуоресцентными зондами одношаговым методом. В реакционную смесь перед лиофилизацией могут быть добавлены праймеры и зонды для снижения количества шагов пробоподготовки при проведении ПЦР.

Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения и изменить их условия. Хранение ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) после лиофилизации в течение трех месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°C не снижает эффективность ОТ-ПЦР.

ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) содержит все необходимые компоненты, включая ферменты, и готов к применению для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в исходном виде (до лиофилизации).

В состав ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) входит M-MuLV –РН и HS-Taq ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

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

HS-Taq ДНК-полимераза, представляет собой рекомбинантную Taq ДНК-полимеразу, инаktivированную специфическими моноклональными антителами. HS-Taq ДНК-полимераза неактивна при температуре до 70°C. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР при короткой 5-и минутной инкубации при 95°C. 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.

Состав набора

Каталожный номер	ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
FRM03-80	2 × 0,5 мл	2 × 0,5 мл	80
FRM03-400	4 × 1,25 мл	4 × 1,25 мл	400

Состав ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×):

100 мМ Трис-НСl, рН 8.3 (при 25 °С), 140 мМ КСl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ MgCl₂, стабилизаторы и усилители ферментов, ингибитор РНКаз, M-MuLV –RN ревертаза, HS-Taq ДНК-полимераза, стабилизаторы и криопротекторы.

Применение

- Разработка лиофилизированных наборов для ПЦР-диагностики
- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RN ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Не теряет активности при разморозке/заморозке до 30 раз;
- Может быть лиофилизированна;
- 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.

Протокол проведения сублимационной сушки (лиофилизации)

Для лиофилизации ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) рекомендуется использовать лиофильные сушилки (сублиматоры) с греющимися полками. Лيوфилизацию можно проводить как исходной 2× смеси (по 12,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), так и разведенной до 25% (по 15,5 мкл для реакции объемом 25 мкл), например, после добавления праймеров.

Рекомендуемая программа сублимационной сушки

Шаг программы	Температура полки, °C	Время инкубации, мин	Давление в камере, Па
1	-40	180	100000
2	-40	120	10-15
3	-20	120	10-15
4	-10	120	10-15
5	0	90	10-15
6	10	120	10-15
7	20	180	10-15

После лиофилизации **смесь** может быть легко восстановлена добавлением воды без нуклеаз. При ресуспендировании можно менять кратность получаемой смеси объемом добавляемой воды.

Лиофилизированную реакционную смесь рекомендовано хранить в месте, защищенном от попадания света: при +25 °C – до 3 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C – 24 месяца. Условия хранения лиофилизированной реакционной смеси с добавлением праймеров и зондов могут отличаться и требуют подтверждения.

Протокол проведения ОТ-ПЦР

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

Для проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ с использованием 2× реакционной смеси **ФармМастер** ОТ-ПЦР-РВ (2×) рекомендуем использовать следующий протокол:

1. Поместить тонкостенные пробирки для ПЦР в лед и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)	12,5 мкл	1×
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.

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.
4. Проведите ПЦР, используя один из рекомендованных режимов:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10–15 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	10 сек	30–50
Отжиг	50 – 68 (T_m -5)	10 сек	
Элонгация	72	20 сек	

Либо:

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

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света: при +4 °C – 3 недели; при -20 °C – 1 год; не более 30 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.