



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

БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×)

Кат. номер RM06-40, RM06-200

Описание:

БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×) предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 9 kb) и сложных матриц одношаговым методом. Набор содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстра, содержащий все необходимые компоненты (за исключением ферментов, РНК матрицы и праймеров); смесь ферментов БиоМастер Экстра-микс, Воду, обработанную ДЭПК, ДМСО и буфер для нанесения (6×).

В состав БиоМастер Экстра-микс входит RNAscribe RT ревертаза, HS-Taq ДНК-полимераза и *Pfu* ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

RNAscribe RT – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность и проявляет оптимальную активность при 55°C (активна до 65°C). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 9 т.о. и включать модифицированные основания. Его быстрая скорость реакции позволяет выполнять синтез всего за 15 минут, а высокая рабочая температура фермента (до 65°C) обеспечивает высокий выход и специфичность реакции.

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°C 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 9 т.п.о. Продукты, полученные с помощью БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×), преимущественно содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

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

Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для ОТ-ПЦР–Экстра	БиоМастер Экстра-микс	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК	Буфер для нанесения (6×)
RM06-40	2 × 0,5 мл	1 × 80 мкл	1 × 0,1 мл	2 × 0,5 мл	1 × 0,5 мл
RM06-200	4 × 1,25 мл	1 × 0,4 мкл	1 × 0,2 мл	3 × 1,8 мл	1 × 1 мл

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР–Экстра:

100 мМ Трис-НCl, рН 8.3 (при 25°C), 140 мМ KCl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ TCEP, стабилизаторы и усилители ферментов.

Состав 25× БиоМастер Экстра-микс:

50 мМ Трис-НCl, рН 8.0 (при 25 °C), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) IGEPAL, ингибитор РНКаз, RNAscribe RT 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 RNAscribe RT ревертазы, HS-Taq и *Pfu* ДНК-полимераз;
- Обеспечивает длительное хранение (хранение БиоМастер ОТ-ПЦР–Экстра (2×) в течение 5 дней при комнатной температуре и многократное замораживание– размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР);

Преимущества использования

- Нарботка кДНК при высокой температуре (до 65° C);
- 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>

1. Разморозить 2× буфер для ОТ-ПЦР–Экстра 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–Экстра	25 мкл	1×
БиоМастер Экстра-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 зависимости от количества матрицы, длины и сложности амплифицируемого фрагмента добавляемый объем БиоМастер Экстра-микс может варьироваться от 1 до 4 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, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	55*	30–50 мин	1
Предварительная денатурация	92–93	5 мин	1
Денатурация	93	5–15 сек	
Отжиг	50 – 68 (T _m –5)	10–20 сек	25–50
Элонгация	68	0,5 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	68	5–15 мин	1

* – ревертаза работает без значительной потери активности до 65° C, возможно, для получения длинных фрагментов понадобится снизить температуру шага ОТ.

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

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофоретическим методом.

Примечание: для разделения продуктов реакции электрофоретическим методом мы рекомендуем использовать 1хTAE 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 65 °С и/или добавить реагенты, способствующие расплавлению вторичной структуры нуклеиновых кислот (например, ДМСО).

Условия хранения

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

Условия транспортировки

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