



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 мыши

Кат. номер НКГ-M-010

### Описание

«Набор праймеров на мРНК НКГ мыши» содержит праймеры на фрагменты пяти мРНК генов «домашнего хозяйства» мыши 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  $100 \pm 10$  %.

### Назначение

Набор предназначен для амплификации фрагментов мРНК генов «домашнего хозяйства» *B2m*, *B-act*, *Cphn*, *Gapdh*, *Gusb Mus musculus* в биологическом образце методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с шагом обратной транскрипции с интеркалирующим красителем SYBR Green. Материалом для проведения ПЦР служат пробы 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 ( $100 \pm 10$  %) 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 (20x)	150 мкл	1 пробирка
Микс $\beta$ -Act праймеры (20x)	150 мкл	1 пробирка
Микс Crhn праймеры (20x)	150 мкл	1 пробирка
Микс Gapdh праймеры (20x)	150 мкл	1 пробирка
Микс Gusb праймеры (20x)	150 мкл	1 пробирка

### Проведение исследования

#### Протокол постановки ПЦР

##### A. Подготовка проб для проведения ПЦР

1. Разморозить пробирки с реагентами БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (RM04-80 или RM04-400), Стерильную воду, Микс праймеры (20x) – 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 реакцию 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-PB (2x)	12,5 мкл
БиоМастер-микс	1 мкл
Микс праймеры/зонд (20x)	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.

**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.

- Добавить отдельными наконечниками в пробирки с готовой реакционной смесью по 10 мкл (можно брать от 1 до 10 мкл, разницу компенсировать водой) образца, в пробирки для контролей по 10 мкл соответствующих контролей.
- 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

- Включить амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить программу.
- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки реакционного модуля прибора (лунки пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).
- 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, °С	Время инкубации	Кол-во циклов	Измерение флуоресценции
Обратная транскрипция	45	10 мин	1	-
Предварительная денатурация	50	2 мин	1	-
Денатурация	95	5 мин	1	-
Отжиг	95	10 сек	-	-
	60	30 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 соответствующего флуорофора регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК.

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
B-act	90
Cphn	85
Gapdh	88
Gusb	84

#### **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.