



БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX (2×)

Кат. номер RM01HR-80, RM01HR-400

Описание:

Набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX (2×) содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX, содержащий все необходимые компоненты (за исключением РНК матрицы и праймеров); БиоМастер-микс-Экстрим 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 на амплификаторах, поддерживающих нормализацию данных по флуоресцентному красителю ROX.

В состав БиоМастер-микс-Экстрим входит RNAscribe RT и HS-Taq 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 50°C (активна до 60°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 60°C) обеспечивает высокий выход и специфичность реакции.

HS-Taq ДНК-полимераза, представляет собой рекомбинантную Taq ДНК-полимеразу, инактивированную 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*.

2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР. Набор подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX в концентрации 450 нМ:

Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX	БиоМастер-микс-Экстрим	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
RM01HR -80	2 × 0.5 мл	1 × 80 мкл	2 × 0.5 мл	80
RM01HR -400	4 × 1.25 мл	1 × 400 мкл	3 × 1.8 мл	400

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25°C), 140 мМ КСl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ MgCl₂, 10 мМ TCEP, 500 нМ флуоресцентный краситель ROX, стабилизаторы и усилители ферментов.

Состав БиоМастер-микс-Экстрим:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.0 (при 25 °С), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) IGEPAL, ингибитор РНКаз, RNAscribe RT 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 RNAscribe RT ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы
- Обеспечивает длительное хранение (хранение БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX (2×) в течение 10 дней при комнатной температуре и многократное замораживание-размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР)
- Смесь не содержит красители, что делает её универсальной.

Пассивный флуоресцентный краситель ROX

В состав смеси входит пассивный флуоресцентный краситель ROX, служащий внутренним стандартом для нормализации сигнала красителей, входящих в состав олигонуклеотидных зондов, при работе на ПЦР платформах, поддерживающих такую возможность (Applied Biosystems). ROX позволяет корректировать вариации между пробирками (лунками), возникающие из-за ошибок пипетирования, флуктуации флуоресценции. Присутствие ROX не оказывает влияния на протекание ПЦР и измерение уровня флуоресцентного сигнала, если смесь используется с другими ПЦР-платформами. Необходимо, однако, учитывать, что включение ROX в смесь ограничивает использование этого флуорофора для олигонуклеотидных зондов, а также других красителей, имеющих схожие спектральные характеристики (Em ~ 621нм).

Преимущества использования

- Ревертаза способна работать при 60°C;
- 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

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

1. Разморозить 2× буфер для ОТ-ПЦР-Экстрим Hi-ROX 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-Экстрим Hi-ROX	12,5 мкл	1×
БиоМастер-микс-Экстрим	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 (не входит в состав набора) 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, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	50-55	10-20 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	
Отжиг	50-68 (T_m-5)	10-20 сек	30-50
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	

Либо:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	50-55	10-20 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-10 сек	30-50
Отжиг/ элонгация	50-68	40-60 сек	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

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 60 °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

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