



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-РВ-Экстрим (2×)

Кат. номер RM01-80, RM01-400

Описание:

Набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ-Экстрим (2×) содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ-Экстрим, 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.

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*. Рекомбинантная HS-Taq ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.о.

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

Состав набора

| Каталожный номер | 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ-Экстрим | БиоМастер-микс-Экстрим | Вода, обработанная ДЭПК | Кол-во реакций по 25 мкл |
|------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| RM01-80 | 2 × 0.5 мл | 1 × 80 мкл | 2 × 0.5 мл | 80 |
| RM01-400 | 4 × 1.25 мл | 1 × 400 мкл | 3 × 1.8 мл | 400 |

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ-Экстрим:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25°C), 150 мМ КСl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ MgCl₂, 10 мМ ТСЕР, стабилизаторы и усилители ферментов.

Состав БиоМастер-микс-Экстрим:

50 мМ Трис-НСl, рН 8.0 (при 25°C), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) NP-40, 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-РВ-Экстрим (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.

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-РВ-Экстрим 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 |
|--------------------------------|------------|-----------------------|
| 2x смесь для ОТ-ПЦР-РВ-Экстрим | 12,5 мкл | 1x |
| 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.

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

| 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 | |
| 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 | |
| Отжиг/ элонгация | 50-68 | 40-60 сек | 30-50 |

- Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Оптимизация условий реакции

- В случае необходимости, объем реакции можно варьировать от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяя количество всех компонентов.
- 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 термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.