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°С 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–RH и HS-Taq ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

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

HS-Taq ДНК-полимераза, представляет собой рекомбинантную Taq ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. HS-Taq ДНК-полимераза неактивна при температуре до 70°С. Активация осуществляется на первом цикле ПЦР при короткой 5-и минутной инкубации при 95°С. 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 20 мкл
FRM03-80	2 × 0,4 мл	2 × 0,4 мл	80
FRM03-400	4 × 1 мл	4 × 1 мл	400

Состав ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×):

100 мМ Трис-HCl, pH 8.3 (при 25 °C), 140 мМ KCl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ $MgCl_2$, стабилизаторы и усилители ферментов, ингибитор РНКаз, M-MuLV –RH 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 –RH 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. Лиофилизацию можно проводить как исходной 2× смеси (по 10 мкл для реакции объемом 20 мкл), так и разведенной до 25% (по 12,5 мкл для реакции объемом 20 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 °С – до 3 месяцев; при +4 °С – до 12 месяцев; при -20°С - 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 20 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
ФармМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×)	10 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 20 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 Tm праймеров при составлении программы.

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

Шаг	Температура, °С	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 (Tm-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.