



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

ЛyoМастер ОТ-ПЦР-РВ

Кат. номер LRM03-100, LRM03-500

Описание:

Набор реагентов ЛyoМастер ОТ-ПЦР-РВ содержит лиофилизированную смесь ОТ-ПЦР-РВ, содержащую все необходимые компоненты, включая ферменты для проведения реакции, 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 ЛyoМастер ОТ-ПЦР-РВ 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 H. Ревертаза M-MuLV –RH обладает повышенной термостойкостью и проявляет активность до 50°C.

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.

ЛyoМастер ОТ-ПЦР-РВ оптимизирована для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР. Лيوфилизированная форма удобна в обращении, не требует специального температурного режима для транспортировки и хранения реактива. Для подготовки реагента к использованию достаточно добавить воду, обработанную ДЭПК.

Состав набора

Каталожный номер	ЛyoМастер ОТ-ПЦР-РВ	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 20 мкл
LRM03-100	2 × 0,5 мл	2 × 0,5 мл	100
LRM03-500	10 × 0,5 мл	3 × 1,8 мл	500

Состав LyoMaster ОТ-ПЦР-РВ при разведении в 0,5 мл воды:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.3 (при 25 °С), 140 мМ КCl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ MgCl₂, стабилизаторы и усилители ферментов, ингибитор РНКаз, M-MuLV –RN ревертаза, HS-Taq ДНК-полимераза, криопротекторы.

Применение

- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RN ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Реакционная смесь представлена в лиофилизированной форме и не требует особых температурных условий хранения;
- Технология сублимационной сушки позволяет увеличить сроки длительного хранения. Хранение LyoMaster ОТ-ПЦР-РВ (2×) в течение шести месяцев при комнатной температуре и двенадцати месяцев при температуре +4°С не снижает эффективность ПЦР.
- 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.

Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 1 т.п.о.

Протокол

Лيوфилизированная форма реакционной смеси позволяет более гибко подходить к схеме её использования. Ниже представлено три варианта протоколов использования лиофилизированной смеси **LyoMaster HS-qPCR: базовый, модифицированный и кастомизированный.**

Базовый протокол

Базовый протокол предполагает получение 2× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 500 мкл стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Модифицированный протокол

Модифицированный протокол предполагает получение 4× реакционной смеси после ресуспендирования сухой смеси. Для этого нужно внести 250 мкл

стерильной воды в лиофилизированную реакционную смесь и тщательно перемешать.

Кастомизированный протокол

Кастомизированный протокол – это протокол, разработанный пользователем. Данный подход может быть удобен при использовании всего объема пробирки, например, для тестирования с одной парой праймеров или при ином варианте. Пользователь самостоятельно может определять объем и состав растворителя. В случае кастомизированного подхода объем реакции можно варьировать, а кратность смеси зависит от выбранного объема растворителя.

Состав реакционной смеси для проведения амплификации.

1. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 20 мкл (**для базового и модифицированного протоколов**):

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация
LyоMaster ОТ-ПЦР-РВ (2х)/(4х)	10/5	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 T_m праймеров при составлении программы.

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

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10–15 мин	1
Предварительная денатурация	92–94	5 мин	1
Денатурация	94	5–10 сек	
Отжиг	50 – 68 (T_m-5)	5–15 сек	30–50
Элонгация	72	0,5–1 мин/т.п.о.	

Либо:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10–15 мин	1
Предварительная денатурация	92–94	5 мин	1
Денатурация	94	5–10 сек	30–50
Отжиг/ Элонгация	50 – 68	30–60 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 50°C и/или добавить реагенты, способствующие расплавлению вторичной структуры нуклеиновых кислот (например, ДМСО).

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:

при +25 °C – до 6 месяцев; при +4 °C – до 12 месяцев; при -20°C – 18 месяцев.

Условия транспортировки

Транспортировка при температуре окружающей среды до 14 суток, при этом, температура не должна превышать +30°C. **Берегите от влаги!**