



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 – Color (2×)

Кат. номер RMC02-40, RMC02-200

### Описание:

БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2×) содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР-Color, содержащий все необходимые компоненты (за исключением РНК матрицы и праймеров); БиоМастер-микс и Воду, обработанную ДЭПК. Набор предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) одношаговым методом.

В состав БиоМастер-микс 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.

Буфер оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР. Повышенная плотность раствора и маркерный краситель облегчают нанесение на гель.

### Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для ОТ-ПЦР-Color	БиоМастер-микс	DMCO	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 50 мкл
RMC02-40	2 × 0,5 мл	1 × 80 мкл	0,5 мл	2 × 0,5 мл	40
RMC02-200	4 × 1,25 мл	1 × 400 мкл	0,5 мл	3 × 1,8 мл	200

## Состав 2\* буфер для ОТ-ПЦР-Color:

100 мМ Трис-НСl, рН 8.3 (при 25°C), 150 мМ КСl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 8 мМ ДТТ стабилизаторы и усилители ферментов, а также маркерный краситель.

## Состав БиоМастер-микс:

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, M-MuLV –RN ревертаза и HS-Taq ДНК-полимераза.

## Применение

- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая стандартная ОТ-ПЦР

## Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RN ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Обеспечивает длительное хранение (хранение БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2x) в течение 2 дней при комнатной температуре и многократное замораживание- размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР);
- Смесь содержит красители, не влияющие на работу полимеразы, и компоненты, увеличивающие плотность пробы, для удобства нанесения на гель.

**Примечание:** подвижность красителей в 0.5 – 1.5% агарозном геле

Ксилен цианол	Бромфеноловый синий	Orange G	Тартразин
10000 – 4000 п.о.	500-400 п.о.	<100 п.о.	<20 п.о.

## 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;
- Сокращает стадию пробоподготовки для анализа результатов ПЦР. Благодаря высокой плотности смеси добавления в пробу буфера для нанесения не требуется.

## Ограничения к использованию

Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 т.п.о.

## Протокол

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

1. Разморозить 2× буфер для ОТ-ПЦР-Color и тщательно перемешать.
2. Поместить тонкостенные пробирки для ПЦР в лед и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
2× смесь для ОТ-ПЦР-Color	25 мкл	1×
БиоМастер-микс	2 мкл	
Прямой праймер	переменный	0,1 – 500 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 500 нМ
РНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 50 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.

**Примечание:** в зависимости от копийности и сложности гена добавляемый объем БиоМастер-микс может варьироваться от 1 до 3 мкл на реакцию объемом 50 мкл.

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.

**Примечание:** в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавьте в каждую пробирку каплю (25–35 мкл) минерального масла.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5–15 сек	
Отжиг	50 – 68 ( $T_m-5$ )	5–20 сек	25–45
Элонгация	72	0,5–1 мин/т.п.о.	
Финальная элонгация	72	5–15 мин	1

$T_m$  - температура плавления дуплекса матрица/праймер, определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета  $T_m$  можно воспользоваться формулой:  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ .

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения.

**Примечание:** для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1xTAE буфер с бромистым этидием.

#### **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 °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**

Транспортировать в термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.