



## БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX (2×)

Кат. номер RM03LR-80, RM03LR-400

### Описание:

Набор реагентов **БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX (2×)** содержит **2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX**, 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 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** входит M-MuLV –РН и *HS-Taq* ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

M-MuLV –РН – 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 –РН 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.

**2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX** оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР. Набор подходит для амплификаторов, обеспечивающих нормализацию сигнала по пассивному референсному красителю ROX в концентрации 30 нМ: Life Technologies (ABI) 7500, 7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio 12K; Stratagene Mx4000, Mx3005P, Mx3000P.

### Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX	25× БиоМастер-микс	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
RM03LR-80	2 × 0,5 мл	1 × 80 мкл	0,2 мл	2 × 0,5 мл	80
RM03LR-400	4 × 1,25 мл	1 × 400 мкл	0,5 мл	3 × 1,8 мл	400

### **Состав 2\* буфер для ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX:**

100 мМ Трис-НСl, рН 8.3 (при 25 °С), 140 мМ КСl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 8 мМ ДТТ, 50 нМ флуоресцентный краситель ROX, стабилизаторы и усилители ферментов.

### **Состав 25\* БиоМастер-микс:**

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, нгибитор РНКаз, M-MuLV –РН 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 M-MuLV –РН ревертазы и *HS-Taq* ДНК-полимеразы
- Обеспечивает длительное хранение (**хранение БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ Lo-ROX (2\*)** в течение 2 дней при комнатной температуре и многократное замораживание-размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР)
- Позволяет проводить нормировку по флуоресцентному красителю ROX
- 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 ~ 621nm).

### **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 5 т.п.о.

### 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-PB Lo-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-PB Lo-ROX	12,5 мкл	1×
25× БиоМастер-микс	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 от 1 до 5% от конечного объема реакционной смеси. При этом учитывайте изменение T<sub>m</sub> 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	45	10-30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	10-20 сек	
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	10-20 сек	30-50
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	

Либо:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10-30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 сек	
Отжиг/ Элонгация	50 – 68	1 мин	30-50

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 +4 °C – 3 недели; при -20 °C – 1 год; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

### Условия транспортировки

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