



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-Премиум (2×)**

Кат. номер RM05-40, RM05-200

### **Описание:**

БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×) ×) предназначен для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с длинных (до 7 kb) и сложных матриц одношаговым методом. Набор содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР-Премиум, содержащий все необходимые компоненты (за исключением ферментов, РНК матрицы и праймеров); смесь ферментов БиоМастер Премиум-микс, Воду, обработанную ДЭПК, ДМСО и буфер для нанесения (6×).

В состав БиоМастер Премиум-микс входит M-MuLV –RNH, HS-Taq ДНК-полимераза и Pfu ДНК-полимераза в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

M-MuLV-RN – 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 –RN обладает повышенной термостойкостью и проявляет активность до 50 °С.

Высокоточную ПЦР осуществляет комбинация из двух высокоочищенных ферментов: высокопроцессивной рекомбинантной HS-Taq ДНК-полимераза и Pfu ДНК-полимеразы с корректирующей активностью. Смесь полимераз неактивна при комнатной температуре. Для активации ферментов необходим прогрев реакционной смеси при 92–93 °С в течение 5 мин.

Сочетание полимераз позволило повысить точность и надежность амплификации в несколько раз по сравнению с Taq ДНК-полимеразой. Совместное использование двух ферментов дает возможность нарабатывать ПЦР-продукты до 7 т.п.о. Продукты, полученные с помощью БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×), преимущественно содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

Буфер оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР.

## Состав набора

| Каталожный номер | 2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум | БиоМастер Премиум-микс | ДМСО       | Вода, обработанная ДЭПК | Буфер для нанесения (6×) |
|------------------|-----------------------------|------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| RM05-40          | 2 × 0,5 мл                  | 1 × 80 мкл             | 1 × 0,1 мл | 2 × 0,5 мл              | 1 × 0,5 мл               |
| RM05-200         | 4 × 1,25 мл                 | 1 × 0,4 мл             | 1 × 0,2 мл | 3 × 1,8 мл              | 1 × 1 мл                 |

### Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР–Премиум:

100 мМ Трис-НCl, pH 8.3 (при 25 °C), 150 мМ KCl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 8 мМ ДТТ стабилизаторы и усилители ферментов.

### Состав 25× БиоМастер Премиум-микс:

50 мМ Трис-НCl, pH 8.0 (при 25 °C), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50 % (v/v) глицерин и 0.1 % (v/v) IGEPAL, ингибитор РНКаз, M-MuLV –RN ревертаза, HS-Taq ДНК-полимераза и Pfu ДНК-полимераза.

## Применение

- Анализ экспрессии генов
- Одношаговая высокоточная ОТ-ПЦР
- Нарботка продуктов для клонирования

## Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной и эффективной работы M-MuLV –RN ревертазы, HS-Taq и Pfu ДНК-полимераз;
- Обеспечивает длительное хранение (хранение БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум (2×) в течение 2 дней при комнатной температуре и многократное замораживание– размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР);

## Преимущества использования

- Высокая специфичность;
- Высокая точность ПЦР (выше, чем у Taq ДНК-полимеразы)
- Высокая чувствительность;
- 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 праймеров с неполной комплементарностью

## 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–Премиум 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–Премиум | 25 мкл     | 1×                    |
| БиоМастер Премиум–микс      | 2 мкл      |                       |
| Прямой праймер              | переменный | 0,1 – 600 нМ          |
| Обратный праймер            | переменный | 0,1 – 600 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 Премиум–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, °C     | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|
| Обратная транскрипция       | 45                  | 30 мин          | 1                 |
| Предварительная денатурация | 92–93               | 5 мин           | 1                 |
| Денатурация                 | 93                  | 5–15 сек        |                   |
| Отжиг                       | 50 – 68 ( $T_m$ –5) | 10–20 сек       | 25–50             |
| Элонгация                   | 68                  | 0,5 мин/т.п.о.  |                   |
| Финальная элонгация         | 68                  | 5–15 мин        | 1                 |

$T_m$  – температура плавления дуплекса матрица/праймер, определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета  $T_m$  можно воспользоваться формулой  $T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ .

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофоретическим методом.

**Примечание:** для разделения продуктов реакции электрофоретическим методом мы рекомендуем использовать 1хTAE буфер с бромистым этидием.

**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.  |

### **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.