



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 SYBR Blue (2×)

Кат. номер RM04-80, RM04-400

Описание:

Набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) содержит 2× буфер для ОТ-ПЦР с SYBR, содержащий все необходимые компоненты (за исключением РНК матрицы и праймеров) и интеркалирующий краситель SYBR Green I; БиоМастер-микс и Воду, обработанную ДЭПК. Набор предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ) 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 H. 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.

2× буфер для ОТ-ПЦР с SYBR оптимизирован для эффективного протекания как ОТ, так и ПЦР в режиме реального времени. Добавки и усилители, входящие в него, позволяют проводить эффективную ОТ-ПЦР со сложных и GC-богатых матриц. Инертный краситель в составе 2× буфера для ОТ-ПЦР с SYBR окрашивает его в голубой цвет и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многоруночных планшетов.

Состав набора

Каталожный номер	2× буфер для ОТ-ПЦР с SYBR	БиоМастер-микс	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК	Кол-во реакций по 25 мкл
RM04-80	2 × 0,5 мл	1 × 80 мкл	0,1 мл	2 × 0,5 мл	80
RM04-400	4 × 1,25 мл	1 × 400 мкл	0,2 мл	3 × 1,8 мл	400

Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР с SYBR:

100 мМ Трис-НCl, pH 8.3 (при 25°C), 100 мМ KCl, 0.6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ, стабилизаторы и усилители ферментов, флуоресцентный краситель SYBRGreen I и инертный краситель.

Состав 25× БиоМастер-микса:

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 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 –RN ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы;
- Обеспечивает длительное хранение (хранение БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) в течение 2 дней при комнатной температуре и/или многократное замораживание- размораживание не снижает эффективность ОТ-ПЦР);
- Смесь содержит флуоресцентный краситель SYBRGreen I, позволяющий проводить мониторинг ПЦР в режиме реального времени.

SYBR Green I

SYBR Green I – флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени. SYBR Green I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов. В ходе амплификации краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР-продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал. Максимумы поглощения и испускания SYBR Green I 494 нм и 521 нм, соответственно, что позволяет использовать его со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Инертный краситель

Инертный краситель в составе 2× буфера для ОТ-ПЦР с SYBR не снижает эффективность ПЦР и помогает контролировать процесс раскапывания многолуночных планшетов. Максимум абсорбции голубого красителя соответствует 615 нм.

Преимущества использования

- Смесь окрашена для облегчения раскапывания;
- Высокая специфичность;
- Высокая чувствительность (1пг – 1 мкг РНК);
- 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);

Ограничения к использованию

Присутствие флуоресцентного красителя затрудняет использование флуоресцентных зондов.

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 с SYBR 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 с SYBR	12,5 мкл	1×
БиоМастер-микс	1 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 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 Tm праймеров при составлении программы.

Примечание: в зависимости от копииности и сложности гена добавляемый объем БиоМастер-микс может варьироваться от 0,5 до 2 мкл на реакцию объемом 25 мкл.

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

4. Провести ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	10-30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	10-30 сек	
Отжиг	50 – 68 (Tm-5)	10-30 сек	25-50
Элонгация	72	0,5-1 мин/т.п.о.	
Кривая плавления	65 – 95		1

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

5. Мониторинг ПЦР в реальном времени можно проводить при 72 °C, в случае отсутствия неспецифических продуктов (праймер-димеров). Если образуются неспецифические продукты с Tm1 ниже, чем Tm2 целевого продукта, то мониторинг реакции проводят при температуре между Tm1 и Tm2.

Оптимизация условий реакции

1. Объем реакции может варьироваться от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяется количество всех компонентов.
2. При использовании 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 термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 7 дней.