

Информация о продукте

БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2×)

Описание продукта

Набор реагентов **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 маркерные красители облегчают нанесение на гель.

Состав набора

Кат. #	2× буфер для ОТ-ПЦР-Color	БиоМастер-микс	ДМСО	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	2 × 200 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 °С), 150 мМ КCl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 6 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ стабилизаторы и усилители ферментов, а также маркерные красители.

Состав 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) NP-40, M-MuLV –RH 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 –RH ревертазы и *HS-Taq* ДНК-полимеразы,
- Обеспечивает длительное хранение (хранение **БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2×)** 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/RMC02.pdf>

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	5-7 мин	1
Денатурация	95	15 – 30 сек	25 - 45
Отжиг	50 – 68 (Тм-5)	15 - 30 сек	
Элонгация	72	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 $T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

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 1хТАЕ буфер с бромистым этидием.

Оптимизация условий реакции

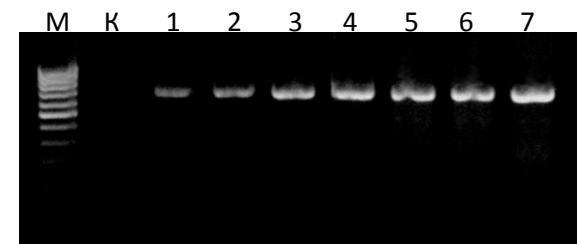
1. В случае необходимости, объем реакции можно варьировать от 10 до 50 мкл, пропорционально изменяя количество всех компонентов.

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).

Хранение и транспортировка: при -20 °С. не более 30 циклов замораживания-размораживания

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки 9 месяцев.

Высокая чувствительность БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2x)



Амплификация фрагмента мРНК гена *HSPA8* человека длиной 570 оснований, с использованием набора реагентов **БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (2x)**. Дорожки: М – ДНК маркер, К – отрицательный контроль, 1 – 7 – продукт ОТ-ПЦР с суммарной РНК в количестве 1 пг – 1 мкг, соответственно, с шагом один порядок.

Правила и рекомендации

Предотвращение загрязнения рибонуклеазами

РНК может быть разрушена РНКазой А, являющейся высокостабильным фактором загрязнения, который может присутствовать в окружающей среде любой лаборатории. Все компоненты набора были тщательно протестированы на отсутствие РНКаз. Для предотвращения загрязнения, как рабочие поверхности стола и приборов, так и используемые растворы должны быть обработаны от РНКаз.

Основные рекомендации для предотвращения загрязнения РНКазами:

- Обработайте диэтилпиокарбонатом (DEPC) все пробирки и наконечники для пипеток, используемые для синтеза кДНК, или используйте сертифицированный свободный от РНКаз пластик.
- При работе с РНК и другими реагентами используйте перчатки, поскольку кожа является источником РНКаз. Чаше меняйте перчатки.
- Используйте свободные от РНКаз реагенты, в том числе высокоочищенную воду (вода, обработанная DEPC).
- Используйте ингибитор РНКаз для защиты РНК от активных РНКаз.
- Храните все компоненты набора плотно закрытыми.
- Во время реакции обратной транскрипции все пробирки должны быть плотно закрыты.

РНК матрица

РНК - важный участник обратной транскрипции и от её качества и количества зависит эффективность процесса. Качество мРНК матрицы определяет объем информации или длину последовательности, которая может быть конвертирована в кДНК посредством обратной транскрипции. Таким образом, важно оптимизировать метод выделения РНК из выбранного биологического источника и предотвратить случайное попадание РНКаз в препарат. Помимо стандартных лабораторных методов выделения суммарной РНК (например, метод выделения РНК экстракцией смесью фенол-хлороформ), существует ряд коммерчески доступных наборов, однако большинство из них не позволяют выделить РНК, не содержащую следовых примесей ДНК, которые могут мешать при дальнейшем анализе с помощью ПЦР. Поэтому, перед использованием РНК в обратной

транскрипции рекомендуется провести её обработку ДНКазой I, свободной от РНКаз.

Большинство библиотек кДНК делается из поли(А)-селектированных мРНК. Присутствие поли(А)-последовательности на 3'-конце мРНК используется для выделения её из суммарной фракции РНК с помощью аффинной хроматографии на олиго(dT)-целлюлозе (доля мРНК в суммарной РНК клеток млекопитающих обычно 1-5%). Когда количество источника РНК ограничено и аффинная хроматография не выполнима, возможен эффективный синтез кДНК с нефракционированной мРНК. При анализе экспрессии каждого конкретного гена необходимость фракционирования обуславливается уровнем его экспрессии: если анализируемый ген имеет низкий уровень экспрессии, то для его эффективного обнаружения лучше использовать изолированную фракцию мРНК.

Соблюдайте следующие рекомендации для получения образца РНК высокого качества:

Исключайте любое попадание РНКаз. Всегда работайте в стерильных условиях, чистых от РНКаз (RNase-free). Обязательно использование всех изделий из стекла, пластика и растворы для выделения и хранения РНК с маркировкой «RNase-free».

- Проводите предварительную обработку рабочего места с использованием источника УФ-света.
- При выделении и работе с РНК используйте стерильные перчатки.
- На этапах очистки, где отсутствует денатурирующий агент, используйте ингибитор РНКаз. Например, добавьте ингибитор РНКаз в воду, которую планируете использовать для растворения выделенной РНК.
- Используйте для приготовления реакционных смесей и необходимых растворов воду, обработанную диэтилпирикарбонатом.
- Если возможно, используйте свежие образцы для выделения РНК.
- Выбирайте метод гомогенизации, соответствующий вашему образцу.
- Используйте метод выделения, при котором одновременно лизируются клетки и инактивируются РНКазы (с добавлением SDS или гуанидина).
- Выделенная РНК не должна содержать химических добавок (например, этанол, фенол, SDS, гуанидинизотиоцианат и т.д.), используемых в процессе и способных влиять при дальнейшем использовании, особенно в ПЦР.
- Во время проведения эксперимента храните все растворы, содержащие РНК во льду.
- Перед использованием матрицы осадите РНК, используя этанол, затем промойте осадок 70% этанолом. Убедитесь, что следы этанола удалены перед использованием РНК в реакции обратной транскрипции.
- Кратковременное хранение (несколько часов): храните очищенную РНК от +2 до +8 °С до использования. Долговременное хранение: храните очищенную РНК при -70 °С.

Проверить качество препарата РНК можно следующими методами:

- Выделенная фракция мРНК, в геле после электрофореза, должна выглядеть как шмер между 0.5 и 8 т.п.о. Большинство мРНК должно находиться между 1,5 – 2 т.п.о.;
- В составе суммарной РНК эукариот доминируют рибосомальные РНК, поэтому при разгоне в агарозном геле 18S и 28S рРНК должны быть видны как четкие полоски (бенды).
- Чистоту РНК можно оценить спектрофотометрическим методом: соотношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$) чистого препарата РНК равно 1.9 – 2.0, при pH 7 – 8. В случае присутствия примесей белков или других органических молекул

(например, фенола) соотношение уменьшается. При более кислых pH, например, в воде величина $A_{260/280}$ также уменьшается.

Выбор праймера для ОТ-ПЦР

Праймер, используемый для обратной транскрипции, определяет, как размер получаемой кДНК, так и специфичность реакции. В основном для синтеза первой цепи кДНК выделяют три типа праймеров: олиго(dT)₁₂₋₃₀, случайный праймер или ген-специфический праймер.

Неспецифические праймеры

Как ранее упоминалось, многие мРНК эукариот имеют на 3'-концах поли(А) последовательность, поэтому для получения полноразмерных копий кДНК с таких РНК используют праймер олиго(dT)₁₂₋₁₈. Для синтеза кДНК праймер олиго(dT)₁₂₋₁₈ берётся в молярном избытке относительно 3'-поли(А)-концов мРНК. При получении библиотек кДНК часто используют разновидность олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймера – якорный олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймер. Он отличается от исходного олиго(dT)₁₂₋₁₈ наличием двух случайных оснований на 3'-конце, что обеспечивает синтез кДНК с самого начала поли(А)-конца. В силу относительно низкой стабильности РНК в растворах и проявлением ряда ревертаз активности РНКазы Н в таких библиотеках наибольшую представленность имеют 3'-концы мРНК.

Для более равномерной представленности всех последовательностей РНК используют случайный гексапраймер взамен олиго(dT)₁₂₋₁₈ или как дополнение к олиго(dT)₁₂₋₁₈ праймеру. При использовании случайного гексапраймера формирование комплементарных комплексов для начала синтеза кДНК более равномерно распределено по всей длине мРНК молекулы. Однако некоторые последовательности соответствующие 3'-концам мРНК могут быть потеряны в результате особенностей локализации случайного гексапраймера. В дополнение стоит отметить, что случайный гексапраймер обычно используют не только при получении копий мРНК без поли(А)-конца, но и всех других классов РНК. Соотношение количества случайного гексапраймера и РНК является важным параметром при синтезе кДНК и влияет на баланс между средней длиной и количеством получаемого кДНК продукта. Например, в случае SuperScript II 10 праймеров на молекулу мРНК дают приемлемый выход без потери в длине продукта.

Подбор сайт-специфичного праймера

Аmplификация в ОТ-ПЦР специфических РНК последовательностей требует два ПЦР праймера, специфичных к этой последовательности. При подборе таких праймеров необходимо учитывать, что такая пара должна позволять дискриминировать продукт амплификации с кДНК и продукт амплификации с геномной ДНК. Которая может присутствовать в качестве контаминации. Существует два подхода при выборе таких праймеров:

1. Выбирают праймеры, отжигающиеся на последовательности экзона, фланкирующих интрон. С такими праймерами любой продукт амплификации с геномной ДНК будет гораздо длиннее, чем продукт амплификации с кДНК.
2. Выбирают праймеры, частично специфичные к обоим экзонам в областях, граничащих с началом и концом интрона. С такой пары праймеров геномная ДНК не амплифицируется.

Выбор между одно- и двухшаговой ОТ-ПЦР

Обратная транскрипция и последующая ПЦР могут проводиться как по двухшаговому

методу (когда ОТ и ПЦР идут в разных пробирках), так и по одношаговому методу (ОТ и ПЦР проходят последовательно в одной пробирке).

Одношаговый метод ОТ-ПЦР

Объединение синтеза кДНК и амплификации с помощью ПЦР требует схожие буферы и сайт-специфические праймеры, устраняет необходимость открывать реакционную пробирку между шагами ОТ и ПЦР.

Достоинства ОТ-ПЦР в одной пробирке:

1. Более высокая чувствительность, поскольку вся кДНК образца используется как матрица для ПЦР.
2. Снижение шагов пипетирования по сравнению с двухшаговым методом, значительно снижает время необходимое для проведения ОТ-ПЦР и уменьшает ошибку пипетирования.
3. Позволяет провести прямой анализ специфического транскрипта, поскольку используются в обеих реакциях сиквенс-специфические праймеры.
4. Снижает шанс получения контаминаций за счёт уменьшения шагов пипетирования и открывания пробирки.
5. Использование термостабильной ревертазы позволяет повысить температуру реакции обратной транскрипции (50-72 °С), при которой снижается неспецифический отжиг и повышается специфичность реакции за счет удаления вторичной структуры мРНК.

Двухшаговый метод

Достоинства двухшагового метода:

1. Оптимизированные условия реакций. Двухшаговый формат позволяет обе реакции (обратную транскрипцию и ПЦР) проводить при оптимальных условиях, гарантирующих эффективность и точность амплификации.
2. Расширенные возможности. Двухшаговый метод позволяет продукт одной реакции синтеза кДНК использовать для анализа множества транскриптов. Такие возможности находят свое применение в специальных приложениях, таких как быстрая амплификация концов кДНК (rapid amplification of cDNA ends) и дифференциальный дисплей.
3. Амплификация длинных последовательностей. При правильной комбинации обратной транскриптазы и термостабильной ДНК полимеразы в двухшаговой ОТ-ПЦР можно амплифицировать последовательность РНК протяженностью до 9 т.п.о.

Для постановки двухшаговой ОТ-ПЦР рекомендуем использовать для синтеза первой цепи [Набор реактивов ОТ M-MuLV –RH \(R01\)](#). Для амплификации фрагмента до 5 т.п.о. в стандартной ПЦР можно использовать [БиоМастер HS-Taq ПЦР – Color \(2x\)](#) (MHC010), [БиоМастер HS-Taq ПЦР \(2x\)](#) (MH010), [Набор для проведения ПЦР с HS-Taq \(+MgCl₂\) \(KH016\)](#), [Набор для проведения ПЦР с HS-Taq \(KH017\)](#). Для ПЦР-амплификации в режиме реального времени рекомендуем использовать наборы [БиоМастер HS-qPCR \(2x\)](#) (MH020), [БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue \(2x\)](#) (MH030).