



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-Color (2×)**

Кат. номер RMC05-40, RMC05-200

### **Описание:**

БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум-Color (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-Color, 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 –RH, HS-Taq ДНК-полимераза и *Pfu* 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°C.

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°C 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-Color (2×), преимущественно содержат 3'-dA концы, что может быть использовано при клонировании.

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–Премииум–Color | БиоМастер–Премииум–микс | ДМСО       | Вода, обработанная ДЭПК |
|------------------|------------------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| RMC05-40         | 2 × 0,5 мл                         | 1 × 80 мкл              | 1 × 0,1 мл | 2 × 0,5 мл              |
| RMC05-200        | 4 × 1,25 мл                        | 1 × 0,4 мл              | 1 × 0,2 мл | 3 × 1,8 мл              |

### Состав 2× буфер для ОТ-ПЦР–Премииум–Color:

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

### Состав БиоМастер–Премииум–микс:

50 мМ Трис–HCl, pH 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, 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–Премииум–Color (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);
- Сокращает стадию пробоподготовки для анализа результатов ПЦР. Благодаря высокой плотности смеси добавления в пробу буфера для нанесения не требуется.
- 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-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-Премиум-Color | 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, °С     | 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<sub>m</sub> - температура плавления дуплекса матрица/праймер, определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета T<sub>m</sub> можно воспользоваться формулой T<sub>m</sub> (°C) = 2 x (A+T) + 4 x (G+C).

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом.

**Примечание:** для разделения продуктов реакции электрофорезом мы рекомендуем использовать 1xTAE 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°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.