

1970.0040 Экстра-микс для обратной транскрипции и количественной ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом с интеркалирующим красителем RT-qPCR SYBR Blue, 40 реакций, Диаэм

1970.0200 Экстра-микс для обратной транскрипции и количественной ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом с интеркалирующим красителем RT-qPCR SYBR Blue, 200 реакций, Диаэм

Описание продукта

Экстра-микс RT-qPCR SYBR Blue предназначен для проведения обратной транскрипции и количественной ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I. Кроме собственно экстра-микса RT-qPCR, в состав набора входят 2-кратный буфер RT-qPCR SYBR Blue и вода, обработанная диэтилпиракарбонатом (ДЭПК). Буфер оптимизирован для протекания как обратной транскрипции, так и ПЦР (в том числе на сложных и GC-богатых матрицах) и содержит все необходимые компоненты (за исключением РНК- матрицы и праймеров), а также интеркалирующий краситель SYBR Green I. Хранение буфера при комнатной температуре в течение 2 дней не снижает эффективность реакции. Инертный краситель в составе Экстра-микса окрашивает его в голубой цвет (максимум поглощения – 615 нм) и облегчает контроль за раскапыванием смеси при использовании многолуночных планшетов.

Экстра-микс RT-qPCR представляет собой смесь обратной транскриптазы MMLV-RH и HS-Taq ДНК-полимеразы с «горячим» стартом в оптимальном соотношении для протекания обеих реакций.

MMLV–RH – генетически модифицированная обратная транскриптаза (ревертаза) вируса лейкемии мышей (M-MuLV). Она отличается от обратной транскриптазы MMLV дикого типа структурой, каталитическими свойствами и температурным оптимумом активности. Фермент проявляет РНК- и ДНК-зависимую полимеразную активность, но лишен активности РНКазы Н. **MMLV–RH** проявляет оптимальную активность при +42°C (активна до +50°C). Фермент способен синтезировать первую цепь кДНК длиной до 10 т.н. и включать модифицированные основания.

HS-Taq ДНК-полимераза представляет собой рекомбинантную Taq ДНК-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами. **HS-Taq** ДНК-полимераза неактивна при температуре ниже +70°C. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при +95°C в течение 5 мин. Рекомбинантная **HS-Taq** ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной Taq ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*. Скорость продвижения Taq ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 1 т.п.н./мин. Рекомбинантная **HS-Taq** ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР с матрицы до 5 т.п.н.; обладает способностью присоединять аденин к 3'-концу синтезируемой цепи, поэтому продукты ПЦР могут использоваться для ТА-клонирования.

SYBR Green I - флуоресцентный интеркалирующий краситель для количественной и качественной детекции продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени. SYBR Green I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов (в том числе в режиме реального времени). 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 амплификаторами для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Состав набора

Кат. №	Кол-во реакций по 50 мкл	Экстра-микс RT-qPCR	Буфер RT-qPCR SYBR Blue(2x)	ДМСО	Вода, обработанная ДЭПК
1969.0040	40	80 мкл	2 x 0.5 мл	0.5 мл	2 x 0.5 мл
1969.0200	200	2 x 200 мкл	4 x 1.25 мл	0.5 мл	3 x 1.8 мл

Состав Экстра-микса RT-qPCR:

- 50 mM Трис-НСl, рН 8.0 (при +25 °С)
- 100 mM NaCl
- MMLV-RH обратная транскриптаза
- HS-Таq ДНК-полимераза
- 1 mM ЭДТА
- 5 mM дитиотреитол
- 50% (v/v) глицерин
- 0.1% (v/v) NP-40

Состав буфера RT-qPCR SYBR Blue (2x):

- 100 mM Трис-НСl, рН 8.3 (при +25 °С)
- 150 mM KCl
- 0.6 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата
- 10 mM MgCl₂
- 8 mM дитиотреитол
- интеркалирующий краситель SYBR Green I
- инертный краситель
- стабилизаторы и усилители активности ферментов

Преимущества использования экстра-микса:

- Высокая специфичность;
- высокая чувствительность;
- простота и удобство в использовании;
- низкая ошибка пипетирования и вероятности кросс-контаминации;
- стандартизация условий постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах);
- возможность ТА-клонирования ПЦР-продуктов.

Область применения:

- Одношаговая стандартная ОТ-ПЦР.
- Количественный анализ РНК, в том числе анализ экспрессии генов.

Ограничения к использованию:

- Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 тыс. п.н.
- Не рекомендуется использовать для ПЦР с флуоресцентными зондами.

Срок хранения и транспортировка:

9 месяцев при -20 °С; не более 30 циклов замораживания-размораживания экстра-микса RT-qPCR.

Протокол выполнения реакции

1. Разморозьте буфер **RT-qPCR SYBR Blue (2x)**, тщательно перемешайте.
2. Поместите тонкостенные пробирки для ПЦР в лёд и добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
буфер RT-qPCR SYBR Blue(2x)	25 мкл	1x
экстра-микс RT-qPCR	2 мкл*	
Прямой праймер	переменный	0.1 – 0.6 мкМ
Обратный праймер	переменный	0.1 – 0.6 мкМ

зонд	переменный	0.1 - 0.3 мкМ
РНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
ДМСО	0.5-2.5 мкл**	1-5%
Стерильная вода	до 50 мкл	

* В зависимости от копияности и сложности гена объём экстра-микса может варьировать от 1 до 3 мкл.

** 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 амплификации; 5% ДМСО снижает T_m на 5°C. T_m - температура плавления дуплекса матрица/праймер, определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета T_m можно воспользоваться формулой $T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу. 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	10-30 минут	1
Предварительная денатурация	95	5-7 мин	1
Денатурация	95	10-30 сек	25-50
Отжиг	50 - 68($T_m-5°C$)	10-30 сек	
Элонгация	72	1 мин/тыс.п.н	
Кривая плавления	65 - 95		1

5. Мониторинг ПЦР в реальном времени можно проводить при +72°C, в случае отсутствия неспецифических продуктов (праймер-димеров). Если образуются неспецифические продукты с T_{m1} ниже, чем T_{m2} целевого продукта, то мониторинг реакции проводят при температуре в диапазоне между T_{m1} и T_{m2} .

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 обратной транскрипции до +50°C и/или добавить реагенты, способствующие расплавлению вторичной структуры нуклеиновых кислот (например, ДМСО или бетаин).