

**1971.0040 Экстра-микс для обратной транскрипции и ПЦР одношаговым методом RT-PCR Color, 40 реакций, Диаэм**

**1971.0200 Экстра-микс для обратной транскрипции и ПЦР одношаговым методом RT-PCR Color, 200 реакций, Диаэм**

### Описание продукта

**Экстра-микс RT-PCR Color** предназначен для проведения обратной транскрипции и ПЦР одношаговым методом. Кроме собственно **экстра-микса**, в состав набора входят **2-кратный буфер RT-PCR Color**, ДМСО и вода, обработанная диэтилпирикарбонатом (ДЭПК). Буфер оптимизирован для протекания как обратной транскрипции, так и ПЦР и содержит все необходимые компоненты (за исключением РНК-матрицы и праймеров). Хранение буфера при комнатной температуре в течение 2 дней не снижает эффективность реакции. Буфер содержит красители, не влияющие на работу ферментов, и компоненты, увеличивающие плотность пробы, для удобства нанесения на гель.

**Экстра-микс RT-PCR Color** 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.

### Состав набора

| Кат. №           | Кол-во реакций по 50 мкл | Экстра-микс RT-PCR Color | Буфер RT-PCR Color (2x) | ДМСО   | Вода, обработанная ДЭПК |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------|-------------------------|
| <b>1971.0040</b> | 40                       | 80 мкл                   | 2 x 0.5 мл              | 0.5 мл | 2 x 0.5 мл              |
| <b>1971.0200</b> | 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-Taq ДНК-полимераза
- 1 mM ЭДТА
- 5 mM дитиотреитол
- 50% (v/v) глицерин
- 0.1% (v/v) NP-40

### Состав буфера RT-qPCR (2x):

- 100 mM Трис-НСl, рН 8.3 (при +25 °С)
- 150 mM KCl
- 0.6 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата

- 6 мМ MgCl<sub>2</sub>
- 8 мМ дитиотреитол
- стабилизаторы и усилители активности ферментов
- маркерные красители

#### **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.
- Сокращается стадия пробоподготовки для анализа результатов ПЦР - благодаря утяжеляющим добавкам и красителям, не требуется буфер для нанесения пробы на гель.

#### **Область применения:**

- Одношаговая стандартная ОТ-ПЦР.
- Анализ экспрессии генов.

Не рекомендуется использовать для ампликонов длиной свыше 5 тыс. п.н.

#### **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-PCR Color (2x)**, тщательно перемешайте.
2. Поместите тонкостенные пробирки для ПЦР в лёд и добавьте следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

| <b>Компонент</b>           | <b>Объем</b>  | <b>Конечная концентрация</b> |
|----------------------------|---------------|------------------------------|
| <b>буфер RT-qPCR (2x)</b>  | 25 мкл        | 1x                           |
| <b>экстра-микс RT-qPCR</b> | 2 мкл*        |                              |
| <b>Прямой праймер</b>      | переменный    | 0.1 – 0.6 мкМ                |
| <b>Обратный праймер</b>    | переменный    | 0.1 – 0.6 мкМ                |
| <b>зонд</b>                | переменный    | 0.1 - 0.3 мкМ                |
| <b>РНК-матрица</b>         | переменный    | 1 пг – 1 мкг                 |
| <b>ДМСО</b>                | 0.5-2.5 мкл** | 1-5%                         |
| <b>Стерильная вода</b>     | 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<sub>m</sub> праймеров при составлении программы амплификации; 5% ДМСО снижает T<sub>m</sub> на 5°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, °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 (T <sub>m</sub> - 5°C)* | 15-30 сек       |                   |
| Элонгация                   | 72                              | 1 мин/т.п.н.    |                   |
| Финальная элонгация         | 72                              | 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:

$$T_m (°C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C).$$

5. После проведения ПЦР проанализируйте продукты амплификации электрофорезом. Пробы наносятся на гель без добавления буфера для нанесения. Для анализа продуктов реакции рекомендуется электрофорез в агарозном геле с ТАЕ-буфером.

### **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).

### **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 рабочие поверхности стола и приборов и используемые растворы должны быть обработаны от РНКаз. Основные рекомендации для предотвращения загрязнения РНКазами:

- используйте сертифицированный свободный от РНКаз пластик или обработайте диэтилпирикарбонатом (DEPC) все пробирки и наконечники для пипеток, используемые для синтеза кДНК;
- При работе с РНК и другими реагентами используйте перчатки, поскольку кожа является источником РНКаз. Чаще 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 и все пробирки во время реакции обратной транскрипции плотно закрытыми

**РНК-матрица** - 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 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 диэтилпиракарбонатом.
- 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, гуанидина или бета-меркаптоэтанола).
- 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.
- При кратковременном хранении (несколько часов) храните очищенную РНК от +2 до +8 °С. При долговременном хранении храните очищенную РНК при -70 °С.
- Проверить качество препарата РНК можно следующими методами:
  - Чистоту РНК можно оценить спектрофотометрическим методом: соотношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ) 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  $A_{260}/A_{280}$  также уменьшается.
  - 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 полосы (бенды).
  - Наиболее точный метод оценки качества выделенной РНК - электрофорез с помощью Bioanalyzer 2100 (Agilent) или Qiaxcel Advanced (Qiagen). Эти приборы позволяют точно оценить RIN - RNA Integrity Number, или показатель целостности РНК.

### **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. 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 у ряда ревертаз активности РНКазы Н в библиотеках, полученных с помощью олиго(dT), 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 экзонов, 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, т.е. попадающие на стык экзонов. 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).

#### ***Достоинства ОТ-ПЦР в одной пробирке:***

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

#### ***Достоинства двухшагового метода:***

- Оптимизированные условия реакций. Двухшаговый формат позволяет обе реакции (обратную транскрипцию и ПЦР) проводить при оптимальных условиях, гарантирующих эффективность и точность амплификации.
- 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.
- Амплификация длинных последовательностей. При правильной комбинации обратной транскриптазы и термостабильной ДНК полимеразы в двухшаговой ОТ-ПЦР можно амплифицировать последовательность РНК протяженностью до 9 тыс.п.н.

Для постановки двухшаговой ОТ-ПЦР рекомендуем использовать для синтеза первой цепи Набор реактивов **Набор реактивов для обратной транскрипции с MMLV-RN (#1967)**. Для амплификации фрагмента до 5 т.п.н. в стандартной ПЦР можно использовать **Экстра-микс для ПЦР HS-Taq ПЦР (#1960)**, **Экстра-микс для ПЦР HS-Taq ПЦР-Color (#1961)** или **Наборы реактивов для ПЦР с Taq-полимеразой Hot Start (##1957, 1958, 1959)**