

OneTube RT-PCRmix

Смесь для одноэтапного анализа транскриптов РНК методом ПЦР-РВ

Номера по каталогу:

SK101S — на 100 реакций

SK101M — на 500 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Преимущества	4
3. Состав	4
4. Условия хранения и транспортировки	4
5. Метод	5
6. Основные характеристики	5
7. Меры предосторожности.....	5
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	5
9. Биологический материал	6
10. Протокол.....	6
11. Возможные проблемы и способы их решения	9
12. Приложение	9

1. Назначение

Смесь OneTube RT-PCRmix предназначена для одноэтапного анализа РНК методом ПЦР-РВ. Смесь позволяет быстро и надежно проанализировать большое количество образцов РНК, в том числе в высокопроизводительных приложениях. Для амплификации используют праймеры, специфичные к кодирующим участкам генома, зонды типа TaqMan или интеркалирующий краситель, референсный краситель ROX (при необходимости) и универсальный ОТ-ПЦР протокол.

Частный вариант применения: одновременный анализ РНК и ДНК в образце. Этот формат удобен для определения в одном образце РНК- и ДНК-содержащих вирусов, количественной оценки нуклеиновых кислот.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества

- Возможность выбора способа детекции: флуоресцентные зонды типа TaqMan или интеркалирующий краситель.
- В состав OneTube RT-PCRmix входит ревертаза и Taq ДНК-полимераза.
- OneTube RT-PCRmix может применяться в мультиплексной ПЦР для одновременного анализа целевых мишеней и внешнего или эндогенного внутренних контролей.
- Одновременный анализ РНК и ДНК в образце: можно определять РНК- и ДНК-содержащие вирусы, оценивать качество анализируемого материала (например, контроль взятия пробы по наличию геномной ДНК), выполнять качественную и количественную оценку нуклеиновых кислот.
- Снижена вероятность контаминации по сравнению с использованием двухстадийного протокола синтеза кДНК и ПЦР.
- Сокращение времени подготовки и проведения реакции.

3. Состав

Компонент	SK101S 100 реакций	SK101M 500 реакций
5X OneTube RT-PCRmix	600 мкл	3 мл (5 x 600 мкл)

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Минимизируйте циклы замораживания/размораживания, рекомендуемое количество циклов: до 10.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Метод

Принцип метода основан на проведении синтеза кДНК и ПЦР-РВ в одной пробирке. Возможность проведения двух реакций в одной пробирке обусловлена одновременным использованием термостабильной ревертазы (температурный оптимум работы: 55 °С) и полимеразы с «горячим стартом» (полимераза не активна в процессе синтеза кДНК на матрице РНК).

В зависимости от используемого амплификатора может потребоваться добавить референсный краситель ROX. Анализ результатов проводится по графикам флуоресценции.

6. Основные характеристики

- Детекция с использованием флуоресцентных зондов типа TaqMan или интеркалирующего красителя.
- Рекомендуемая длина ампликонов — до 300 п.о.

7. Меры предосторожности

При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. При попадании реагентов на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды. Все компоненты набора в используемых концентрациях и при соблюдении вышеуказанных рекомендаций не представляют опасности для здоровья человека. Подготовку реакционной смеси и внесение РНК в реакцию необходимо проводить на отдельном чистом рабочем месте, где не применяются РНКазы. Во время работы использовать пластик, свободный от РНКаз. Не использовать раствор DEPC (диэтилпирикарбонат) для обработки воды, посуды или пластика, поскольку следы DEPC могут ингибировать ферментативные реакции с РНК.

8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Амплификатор.
- Твердотельный термостат.
- Вортекс.
- Миницентрифуга.
- Автоматические дозаторы на 10, 20, 200 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Пробирки для ПЦР объемом 0.2 мл, совместимые с амплификатором.

9. Биологический материал

Тотальная РНК в количестве от 100 пг до 500 нг.

Рекомендуемое количество РНК в реакции: от 1 нг до 100 нг.

РНК должна быть:

- очищена от ДНК и визуализироваться на агарозном геле в виде четких хорошо различимых полос ($A260/280 \geq 2$, $A260/230 \geq 2.1$);
- выделена стандартизированной методикой. Это позволит снизить разброс концентрации, степени деградации и содержания ингибиторов ПЦР в образцах;
- растворена в воде, свободной от нуклеаз (кат. # PB207S, Евроген).

Для выделения и очистки РНК рекомендуется использовать наборы:

- RNA Solo (кат. ## BC034T/S, Евроген);
- Реагент ExtractRNA (кат. # BC032, Евроген). РНК, выделенную набором ExtractRNA, следует обработать ДНКазой E (кат. ## EK007S/M, Евроген) и осадить спиртом;
- CleanRNA Standard (кат. # BC033, Евроген).

10. Протокол

10.1. Рекомендации по планированию эксперимента

1.1. Реакции с исследуемыми образцами необходимо ставить одновременно с отрицательным контролем без матрицы (NTC) — контроль чистоты реактивов от примесей экзогенной ДНК. В качестве NTC используется вода или буфер, в котором были растворены образцы.

1.2. Рекомендуется включать в эксперимент положительный контроль (ПКО) — образец РНК, на котором ранее были отработаны условия реакции.

1.3. Для получения достоверных результатов все реакции рекомендуется выполнять в двух технических повторах.

1.4. Для подбора праймеров и зондов используйте рекомендации, описанные в Приложении на стр. 9.

10.2. Подготовка реакционной смеси

2.1. Рассчитайте необходимый объем компонентов, исходя из числа образцов, включая контрольные (NTC и ПКО для каждой пары праймеров). Воспользуйтесь для расчета таблицей.

- ▶ Для доведения объема реакционной смеси используйте воду, свободную от нуклеаз (кат. # PB207S, Евроген).
- ▶ Добавьте в реакцию референсный краситель ROX (кат. ## PB023S, PB024, Евроген), если используете амплификатор, требующий его присутствие.

- Если исследуемый образец необходимо развести, то используйте воду, свободную от нуклеаз, или буфер, в котором был элюирован образец.

Компонент	Количество компонента на одну реакцию		Конечная концентрация компонента в реакции
	NTC	Исследуемый образец	
5X OneTube RT-PCRmix	6 мкл	6 мкл	1X
Праймер Rev (10 мкМ)	0.5–1 мкл	0.5–1 мкл	0.2–0.4 мкМ
Праймер For (10 мкМ)	0.5–1 мкл	0.5–1 мкл	0.2–0.4 мкМ
Зонд TaqMan (10 мкМ) или 50X Sybr Green I	0.5–1 мкл 0.25–0.5 мкл	0.5–1 мкл 0.25–0.5 мкл	0.2–0.4 мкМ 0.5–1X
50X ROX (опционально)	0.5 мкл	0.5 мкл	1X
Исследуемый образец	—	до 17 мкл	—
Вода, свободная от нуклеаз	довести до 25 мкл	довести до 25 мкл	—

2.2. Разморозьте компоненты реакционной смеси при комнатной температуре.

- Во время выполнения протокола размороженные компоненты и приготовленную реакционную смесь хранить в охлажденном штативе или на льду.

2.3. Тщательно перемешайте содержимое пробирок.

ВНИМАНИЕ! Смесь 5X OneTube RT-PCRmix имеет повышенную вязкость. Переверните пробирку 4–5 раз, затем импульсно встряхните на вортексе без образования пены. Сбросьте капли со стенок пробирки в миницентрифуге.

2.4. Разморозьте образцы РНК при комнатной температуре и прогрейте 1–2 минуты при +50 °С. Тщательно перемешайте пипетированием, сбросьте капли в микроцентрифуге.

2.5. Приготовьте реакционную смесь: смешайте все компоненты, кроме праймера Rev и образца. Аккуратно перемешайте пипетированием, до использования хранить на льду.

2.6. Подготовьте пробирки для ПЦР.

2.7. В пробирках для ПЦР смешайте праймер Rev и образец (в реакции NTC используйте воду). Прогрейте в течение 3 мин при +65 °С, после чего поместите пробирки в лед.

2.8. Внесите в пробирки реакционную смесь, аккуратно перемешивая пипетированием содержимое пробирок с ней.

2.9. Без промедления аккуратно перенесите пробирки в блок амплификатора.

10.3. Проведение реакции

Стадия	Температура	Время инкубации	Кол-во циклов	Считывание флуоресценции
Обратная транскрипция	55 °С	15 мин	1	нет
Активация полимеразы, инактивация ревертазы	95 °С	1 мин	1	нет
Денатурация	95 °С	15 с		нет
Отжиг	T _m (50–68 °С)	20 с	50	нет
Элонгация и измерение флуоресценции	72 °С	20 с		да
Плавление*	от 55 до 95 °С с шагом 0.5 °С	—	1	да

* Только при детекции с помощью интеркалирующего красителя.

10.4. Анализ результатов

4.1. Анализ NTC:

- если C_q (C_t) не определяется или больше 38, то контроль качества пройден, контаминации экзогенными РНК или ДНК нет;
- если C_q (C_t) меньше 38 и детекция с помощью зондов TaqMan, то контроль качества не пройден, произошла контаминация реакционной смеси. Анализ исследуемых образцов проводить нельзя.
- если C_q (C_t) меньше 38 и детекция с помощью интеркалирующего красителя, то проанализируйте кривую плавления:
 - 1) сигнал обусловлен димерами праймеров. Контроль качества пройден, но при дальнейшем анализе необходимо учитывать вклад сигнала флуоресценции димеров в исследуемых образцах.
 - 2) димеров праймеров нет, в образце присутствует существенное количество геномной ДНК. Анализ исследуемых образцов проводить нельзя.

4.2. Анализ ПКО: сравните результаты с данными, полученными на этапе разработки. Если значимых отличий нет, то контроль качества пройден.

4.3. Анализ исследуемых образцов: полученный результат можно считать достоверным, если пороговый цикл C_q (C_t) для всех технических повторностей меньше или равен 38, а между техническими повторностями разница не более чем 1 цикл.

При исследовании экспрессии эукариот проанализируйте результаты с учетом места посадки подобранных праймеров (см. Приложение).

При использовании интеркалирующего красителя проанализируйте кривую плавления образцов — убедитесь, что температура плавления ПЦР-продукта совпадает с ожидаемой.

11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Не прошел контроль качества образец НТС.	Произошла контаминация реакционной смеси или (в случае использования интеркалирующего красителя) праймеры подобраны неоптимально и образуют димеры.	Необходимо аккуратно переставить ПЦР, сменив воду и аликвоты праймеров. В случае повтора проблемы необходимо сменить набор реагентов. Для исключения неоптимально подобранных праймеров проанализируйте кривые плавления.
2. Не прошел контроль качества образец ПКО.	Во время протокола была допущена ошибка.	Переставьте ПЦР.
3. Пороговый цикл C_q анализируемого образца больше 38 или разброс значений между повторностями более 1 цикла.	1) Недостаточное количество РНК. 2) РНК низкого качества или низкой степени очистки и содержит ингибиторы ферментативных реакций. 3) Неоптимально подобраны условия реакции.	1) Проведите дополнительную очистку РНК, например, набором CleanRNA Standard (кат. # BC033, Евроген). 2) Повторите ПЦР, используя большее количество биоматериала. 3) Повторите выделение РНК из свежего биоматериала. 4) Оптимизируйте условия реакции на образцах ПКО в той же концентрации, что исследуемый образец.
4. Температура пика плавления ПЦР-продукта не совпадает с ожидаемой.	1) Праймеры отжигаются на неспецифический участок, что приводит к наработке нецелевого участка кДНК. 2) Контаминация РНК геномной ДНК, в результате чего происходит амплификация продукта, содержащего интрон. Такие ампликоны чаще имеют более высокую температуру плавления, чем целевой продукт.	1) Проанализируйте праймеры, чтобы убедиться, что они достаточной длины и отжигаются специфично. 2) Обработайте образцы РНК ДНКазой, (кат. ## ЕК007S/М, Евроген).

12. Приложение

Существует несколько вариантов расположения праймеров относительно интронов:

1. Оба праймера расположены внутри одного экзона (фрагмент геномной ДНК совпадает по размеру с фрагментом кДНК). В этом случае остаточная геномная ДНК в образце будет искажать результаты ПЦР и завышать количество кДНК.

2. Праймеры расположены в разных экзонах (между местами их отжига есть интрон). В этом случае амплифицируемый фрагмент ДНК больше фрагмента кДНК, и амплификация гДНК будет затруднена. Тем не менее, это не гарантирует отсутствие подобной амплификации — особенно в случае высокой концентрации ДНК в образце. При такой стратегии оценить вклад амплификации с гДНК можно только с использованием интеркалирующего красителя при анализе кривой плавления.

3. 5'-конец одного из праймеров расположен на одном экзоне, а 3'-конец — на следующем экзоне. Такой праймер отжигается только на синтезированной кДНК, а амплификация с генома исключается. Для максимального эффекта рекомендуется использовать оба праймера на стыках экзонов.

При подборе праймеров рекомендуется использовать вариант 3, допустимо использовать вариант 2.

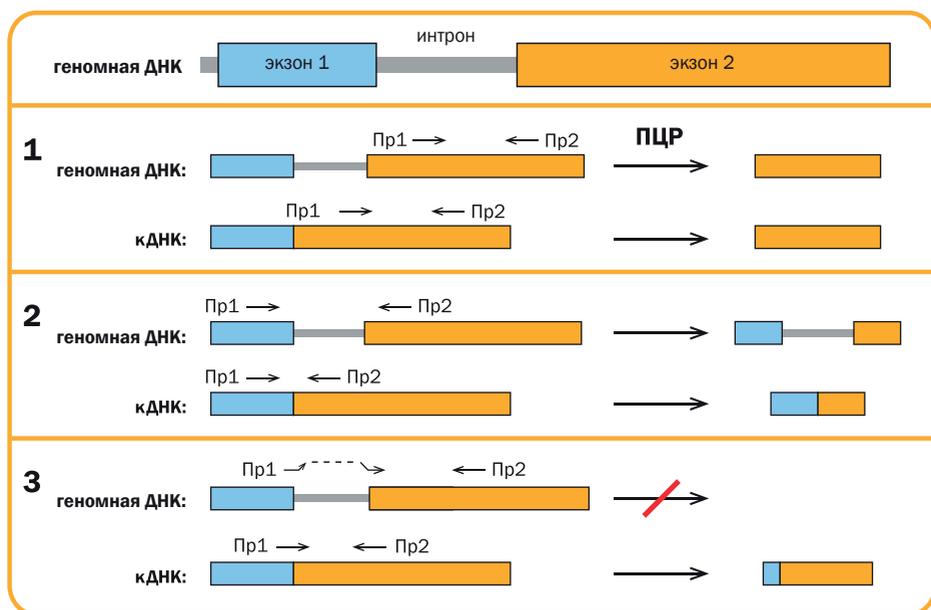


Рисунок 1 – схема вариантов расположения праймеров.

Рекомендации по подбору праймеров

1. Для анализа РНК используйте ген-специфичные праймеры. При подборе праймеров рекомендуется использовать вариант 3. Использование случайных или олиго(dT) праймеров не рекомендуется во избежание амплификации неспецифических продуктов.

2. При изучении экспрессии РНК эукариот место посадки затравочного праймера для синтеза кДНК лучше расположить на стыке экзонов (см. Рисунок 1, вариант 3). Это увеличивает специфическую амплификацию кДНК.

3. Для анализа экспрессии РНК эукариот рекомендуется подбирать праймеры таким образом, чтобы между их сайтами отжига был расположен интрон — это снижает риск амплификации геномной ДНК (см. Рисунок 1, вариант 2 и 3). При расположении обоих праймеров на стыке экзонов геномная ДНК не детектируется.

Расположение праймеров на разных экзонах (Рисунок 1, вариант 2) допустимо при детекции с помощью интеркалирующего красителя, когда происхождение продукта можно определить по кривым плавления.

Если при дизайне праймеров не удастся найти оптимальную мишень для дискриминации транскриптов и геномной ДНК, рекомендуется предварительно обработать образцы РНК ДНКазой, свободной от РНКаз (кат. ## EK007S/М ДНКазы Е).

При анализе геномной ДНК на фоне кДНК мишень выбирают на участке интрона.

При анализе вирусов рекомендуется анализировать несколько вирусных мишеней (1–3), а также мишень на геномную ДНК пробанда, позволяющую контролировать отбор биологического материала. Для тестирования вирусов обработка проб ДНКазой не требуется.

4. Расчет температуры отжига праймеров. Температура отжига (T_m) определяется нуклеотидной последовательностью праймеров. Для приблизительного расчета температуры отжига можно воспользоваться формулой: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$. Оптимальная T_m может отличаться от расчетной. Рекомендуется точно определить ее, используя градиент температур. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов ($T_m + 5^{\circ}\text{C}$) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

5. При подборе последовательности праймеров с помощью онлайн-сервисов необходимо убедиться, что праймеры не образуют шпилечные структуры, не формируют димеры и не отжигаются в неспецифических областях генома исследуемого организма.

Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
PB023S	50X High ROX (25 μM)	1 000 р-ций по 25 мкл
PB024	50X Low ROX (1.5 μM)	1 000 р-ций по 25 мкл
PB025S	Интеркалирующий краситель	200 р-ций по 25 мкл
PB025M	SYBR Green I для ПЦР-PB	1 000 р-ций по 25 мкл
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)

Наборы и сервисы Евроген

Н >>> – ссылка на страницу
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н** >>>

С >>> – ссылка на страницу
СЕРВИСА

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н** >>>

Синтез и амплификация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Клонирование ДНК **Н** >>> **С** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **Н** >>>

Оценка ДНК **Н** >>>

Нормализация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Практикум по геной инженерии **Н** >>>

Генотипирование **Н** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **С** >>>

Синтез генов **С** >>>

Сайт-направленный мутагенез **С** >>>

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru