



Mint

Набор реактивов для синтеза кДНК

Номер по каталогу SK001

Инструкция по применению

Набор реактивов Mint предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Содержание

I. Назначение	1
II. Метод	1
III. Состав и условия хранения	3
III.1. Список компонентов (на 20 реакций)	3
III.2. Необходимые реагенты, не входящие в состав набора	3
IV. Важные рекомендации и замечания	4
IV.1. Как избежать контаминации и деградации РНК и ДНК	4
IV.2. Положительный контроль	4
IV.3. Приготовление реакционных смесей	4
V. Требования к РНК	5
VI. Протокол синтеза кДНК	6
VI.1. Синтез первой цепи и введение PlugOligo	6
VI.2. Амплификация дц-кДНК	9
VI.2.1. Предварительная аналитическая амплифика- ция	9
VI.2.2. Препаративная наработка дц-кДНК	13
VII. Возможные трудности и их решение	16
VIII. Приложение А	19
Список литературы	20

I. Назначение

Набор реактивов “MINT” позволяет осуществлять синтез обогащенной полноразмерными последовательностями двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) на матрице полиА⁺ или тотальной РНК. Набор рассчитан на 20 реакций синтеза кДНК.

Полученная дц-кДНК может быть использована для приготовления ненаправленных библиотек кДНК, псевдо-Нозерн блота [1], супрессивной вычитающей гибридизации кДНК (SSH, [2, 3]), и нормализации кДНК [4, 5] с помощью набора реактивов Trimmer-2 (Евроген кат.# NK003).

- ▶ **Ограничения к применению:** Набор реактивов Mint предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

II. Метод

В основе метода синтеза дц-кДНК лежит свойство MMLV ревертазы добавлять нематрично на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков, преимущественно dC [6]. Схема метода приведена на рис. 1.

Первую цепь кДНК синтезируют на РНК матрице с использованием 3'-праймера, содержащего олиго(dT) последовательность. Образующаяся первая цепь содержит последовательность 3'-праймера на 5' конце и олиго(dC) последовательность на 3' конце.

Эта олиго(dC) последовательность служит местом отжига 30-мерного олигонуклеотидного адаптера (PlugOligo) имеющего комплементарную олиго(dG) последовательность на 3'-конце.

В определенных условиях, создаваемых за счет добавления IP-смеси, ревертаза воспринимает PlugOligo как продолжение РНК матрицы и продолжает синтез первой цепи. Таким образом, первая цепь кДНК оказывается фланкирована с одной стороны последовательностью 3'-праймера, а с другой - последовательностью, комплементарной PlugOligo.

II Метод

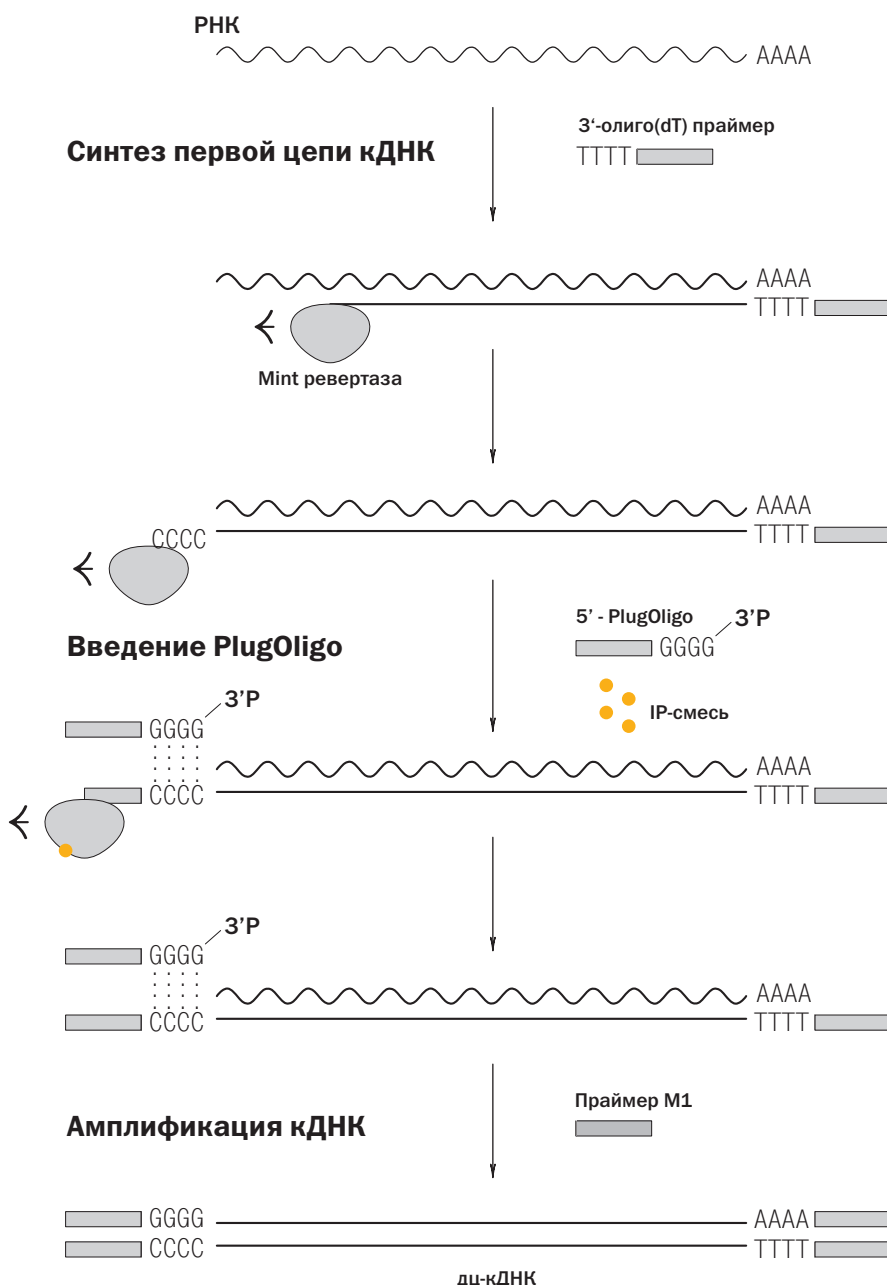


Рис. 1. Схема синтеза кДНК с использованием набора реактивов Mint

Первую цепь кДНК амплифицируют в ПЦР с праймером M1, соответствующим внешней части PlugOligo и 3'-праймера. Использование Epcuso полимеразы (Евроген кат.# PK002S, PK002L) позволяет получать дц-кДНК, обогащенную полноразмерными последовательностями. За счет использования PlugOligo с заблокированным 3'-концом достигается существенное снижение (по сравнению с аналогами) нежелательной фоновой амплификации.

III. Состав и условия хранения

III.1. Список компонентов (на 20 реакций)

Компонент*	Количество
5X буфер для синтеза первой цепи (5X First-Strand Buffer)	80 мкл
DTT (20 мМ)	30 мкл
Смесь dNTP (dNTP mix, 10 мМ каждого)	80 мкл
PlugOligo адаптер (PlugOligo adapter, 15 мкМ)** (5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGG-P-3')	25 мкл
3'-праймер (3'-primer, 10 мкМ)** (5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(Т)30VN -3')	25 мкл
Ревертаза (Mint Reverse Transcriptase)	20 мкл
IP-смесь (IP-solution)	130 мкл
Контрольная тотальная РНК (Control total RNA, 0.5 мкг/мкл)	15 мкл
ПЦР праймер M1 (PCR Primer M1, 10 мкМ) (5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')	100 мкл
50X смесь Encyclo (50X Encyclo polymerase mix)	50 мкл
10X Encyclo буфер (10X Encyclo buffer)	300 мкл
Стерильная вода (Sterile RNase free water)	1.8 мл

*Пробирки, содержащие указанные компоненты, подписаны по-английски, английские названия даны в скобках

**Сайт эндонуклеазы рестрикции Rsa I подчеркнут; N = A, C, G или T; V = A, G или C

Все компоненты хранить при: -20°C

III.2. Необходимые реагенты, не входящие в состав набора:

- Минеральное масло
- Ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion)
/необязательно/
- Реагенты для гель-электрофореза на агарозе
- Маркер молекулярных весов ДНК (ДНК-маркер 1 kb)

IV. Важные рекомендации и замечания

► *Пожалуйста, ознакомьтесь перед началом работы*

IV.1. Как избежать контаминации и деградации РНК и ДНК

Даже небольшие количества посторонней ДНК или РНК-матрицы могут привести к образованию неспецифического продукта в ходе синтеза кДНК. Мы рекомендуем:

- 1) смешивать реагенты для синтеза кДНК в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и РНК и анализа продуктов ПЦР;
- 2) использовать для работы наконечники для автоматических пипеток, имеющие гидрофобный фильтр;
- 3) для мониторинга уровня контаминации включать отрицательный контроль (в реакцию вместо ДНК или РНК-матрицы добавлять стерильную воду) в каждый эксперимент;
- 4) Использовать стерильные одноразовые перчатки.

IV.2. Положительный контроль

Положительный контроль необходим для проверки работы всех компонентов реакции. В состав набора входит контрольная тотальная РНК, которую следует использовать в контрольном эксперименте.

IV.3. Приготовление реакционных смесей

При одновременном проведении нескольких реакций рекомендуется приготовление общих реакционных смесей (master mix), содержащих общие для всех реакций компоненты. Те компоненты, которые варьируют от реакции к реакции, добавляют после разнесения аликвот реакционной смеси по пробиркам для проведения реакции.

Использование общей реакционной смеси позволяет уменьшить вариации в количестве различных компонентов от пробирки к пробирке.

После приготовления реакционной смеси её необходимо перемешать, сбросить оставшиеся на стенках пробирки капли с помощью

быстрого центрифугирования и быстро разнести аликвоты по пробиркам.

При смешивании малых объемов реагентов (например, при добавлении матрицы в реакционную смесь) обратите внимание, чтобы на внешней стороне носика не оставалось дополнительных капель.

Ферменты следует добавлять в последнюю очередь и перемешивать аккуратным пипетированием, избегая вспенивания реакционной смеси.

V. Требования к РНК

► *Пожалуйста, ознакомьтесь перед началом работы*

1) Предлагаемый ниже протокол позволяет синтезировать дц-кДНК на матрице полиА⁺ РНК или тотальной РНК. Минимальное стартовое количество РНК для синтеза первой цепи кДНК составляет 250 нг тотальной или 100 нг полиА⁺ РНК. Для достижения наилучшего результата мы рекомендуем использовать 1-1.5 мкг тотальной РНК или 0.5 - 1 мкг полиА⁺ РНК.

► *Эффективность синтеза кДНК с помощью набора реактивов Mint определяется качеством РНК.*

2) Для выделения РНК рекомендуется использовать реагент ExtractRNA (Евроген кат.# BC032).

3) После выделения РНК мы рекомендуем провести оценку ее качества с помощью гель-электрофореза на агарозе. Можно использовать денатурирующий формальдегидный электрофорез как описано в [7], однако для экспресс-анализа проще выполнить неденатурирующий электрофорез с окрашиванием бромистым этидием (EtBr) как описано в приложении на стр. 19.

В неденатурирующем агарозном электрофорезе РНК, пригодная для синтеза кДНК, имеет следующие характеристики:

- тотальная РНК из тканей млекопитающих выглядит как шмер, содержащий две интенсивные полосы 28S и 18S рибосомальной РНК. Электрофоретическая подвижность этих полос

VI Протокол синтеза кДНК

приблизительно соответствует фрагментам ДНК длиной 4.5 и 1.9 т.п.н. Соотношение интенсивностей полос 28S к 18S РНК не менее 1:1. Изменение соотношения в пользу 18S РНК свидетельствует о частичной деградации образца.

- полиА⁺ РНК млекопитающих выглядит как шмер от 0.1 до 4-7 т.п.н., содержащий слабовыраженные 28S и 18S полосы.
 - РНК из других организмов может иметь иные характеристики, например содержать только одну полосу рибосомальной РНК на уровне 18S [8] или иметь шмер длиной до 2-3 т.п.н.
- ▶ Если РНК имеет длину меньше ожидаемой или выглядит деградированной по данным электрофореза, необходимо проверить чистоту и качество реагентов для выделения РНК и повторить выделение. Частично деградированная РНК (образцы тканей, подвергнутые жестким воздействиям, или из больных пациентов) иногда используется для синтеза кДНК - в частности, когда нет возможности повторно провести выделение РНК. Однако, следует иметь в виду, что количество полноразмерных последовательностей в таком образце снижено. Особенно это относится к протяженным молекулам.
- 4) Наличие геномной ДНК в образцах РНК, как правило, не оказывает заметного влияния на качество синтезируемой кДНК. Использование ДНКаз для удаления геномной ДНК не рекомендуется. В случае необходимости, избыток геномной ДНК может быть удален переосаждением образцов РНК в 12M LiCl или фенол-хлороформной экстракцией.

VI. Протокол синтеза кДНК

VI.1. Синтез первой цепи и введение PlugOligo

- ▶ Для инкубации реакционной смеси используйте ПЦР-амплификатор. Использование воздушного термостата требует дополнительной оптимизации протокола.
- ▶ **Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!**
- 1) Для каждого образца РНК приготовьте первую часть реакционной смеси (в пробирке на 0.2 мл или 0.5 мл), добавляя реагенты

в указанном порядке:

X мкл Стерильная вода

1-3 мкл Раствор РНК (0.25 - 2 мкг РНК)*

- ▶ Для положительного контроля используйте 2 мкл контрольной тотальной РНК, входящей в состав набора Mint

1 мкл 3'-праймер (10 мкМ)

1 мкл PlugOligo

5 мкл Суммарный объем первой части реакционной смеси

- ▶ *Для предотвращения агрегации РНК, перед взятием алиquot прогрейте образцы РНК при 65°C в течение 1-2 мин, перемешайте содержимое и сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

2) Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3) Если ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку для предотвращения испарения реакционной смеси.

4) Закройте пробирки и поместите их в амплификатор.

5) Для денатурации РНК запустите инкубацию пробирок при 70°C в течение 2 мин (используйте нагревающуюся крышку, если это возможно). По истечении времени прогрева снизьте температуру инкубации до 42°C, не вынимая пробирки из амплификатора. Убедитесь, что температура пробирок снизилась до 42°C, после чего добавьте вторую часть реакционной смеси.

- ▶ Пока пробирки нагреваются, выполните стадию б.

Продолжайте инкубацию при 42°C не менее 1-3 мин, до добавления второй части реакционной смеси (см. стадию б).

6) Во время инкубации, описанной на стадии 5, приготовьте вторую часть реакционной смеси, смешивая реагенты в указанном порядке:

Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в

VI Протокол синтеза кДНК

случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

2 мкл 5X Буфер для синтеза первой цепи

1 мкл DTT (20 мМ)

1 мкл Смесь dNTP (10 мМ)

1 мкл Mint ревертаза

5 мкл Суммарный объем второй части реакционной смеси

- ▶ При необходимости, во вторую часть реакционной смеси может быть добавлен ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) из расчета 0.5 мкл на реакцию.
- 7) Аккуратно перемешайте компоненты пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 - 8) Добавьте по 5 мкл полученной РС2 в каждую пробирку с реакционной смесью со стадии 5. РС2 рекомендуется добавлять быстро, в течение 1-3 мин. после снижения температуры до 42°C. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 - 9) Инкубируйте пробирки при 42°C в течение 30 мин, после чего добавьте в каждую пробирку по 5 мкл IP-смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Продолжайте инкубацию при 42°C в течение 1 ч. и 30 мин.
 - ▶ Не держите пробирки с реакционной смесью на комнатной температуре дольше, чем это необходимо, чтобы добавить IP-смесь.
 - 10) После завершения инкубации поместите пробирки в лед (0 - +4°C) для остановки реакции.
 - ▶ В ходе реакции на дне пробирок может сформироваться бурый осадок. Он не мешает синтезу и хранению кДНК.

Полученная первая цепь кДНК может быть использована немедленно для приготовления дц-кДНК (раздел VI.2) или храниться при -20°C в течение 3 месяцев.

VI.2. Амплификация дц-кДНК

▶ **Важные замечания:**

- 1) Использование оптимального количества циклов в ПЦР при амплификации кДНК важно для ряда приложений, таких как псевдо-Нозерн блот [1] или супрессионная вычитающая гибридизация [2, 3]. Избыточное количество циклов ПЦР приводит к накоплению неспецифического продукта ПЦР и может существенно исказить результаты экспериментов. При недостаточном количестве циклов ПЦР получается небольшое количество амплифицированной кДНК. Оптимальное число циклов ПЦР определяется индивидуально конечным пользователем и зависит от природы экспериментальных образцов.
- 2) Используйте первую цепь, полученную с контрольной РНК матрицы для положительного контроля ПЦР.
- 3) Параметры ПЦР в приведенном протоколе оптимизированы для амплификатора MJ Research PTC-200 DNA. Оптимальные параметры могут варьировать в зависимости от модели амплификатора и объема реакционной смеси.

VI.2.1. Предварительная аналитическая амплификация

- 1) Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке*:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 мМ)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 мМ)
1 мкл	50X Encyclo полимеразы
1 мкл	первая цепь кДНК (со стадии VI.1.10)**
<hr/>	
50 мкл	Суммарный объем

Аналитическая реакционная смесь готовится для каждого образца в объеме 50 мкл, после чего разделяется на 3 аликвоты по 16 мкл.

- ▶ * При одновременной работе с несколькими образцами первой цепи

VI Протокол синтеза кДНК

кДНК, рекомендуется приготовить общую реакционную смесь, содержащую все указанные компоненты, кроме ДНК матрицы, после чего разнести по 49 мкл в новые стерильные пробирки и после этого добавить к каждой аликвоте по 1 мкл первой цепи кДНК со стадии VI.1.10

- ▶ ****** Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, который хранили при -20°C , должен быть прогрет при 65°C в течение 1 мин. После прогревания, аккуратно перемешайте содержимое пробирки.
- ▶ Если вы планируете осуществить наработку дц-кДНК сразу после предварительной амплификации, сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на льду при $0 - +4^{\circ}\text{C}$. В ином случае заморозьте её на -20°C .

2) Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3) Приготовьте реакционную смесь в объеме 50 мкл, разделите на аликвоты по 16 мкл в 0.2-мл или 0.5-мл стерильные пробирки для ПЦР. Для каждого образца обозначьте пробирки как <S>1, <S>2, и <S>3, где <S> - идентификатор образца первой цепи.

Мы рекомендуем использовать тонкостенные 0.2-мл пробирки для ПЦР, так как это позволяет достичь большей эффективности реакции.

4) Добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

- ▶ Так как в данном протоколе использованы малые (20-30 мкл) объемы для ПЦР, мы рекомендуем добавлять масло даже в случае, если Ваш амплификатор имеет нагревающую крышку.

5) Осуществите амплификацию, используя следующую инструкцию:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	N* циклов	66°C	20 сек
		72°C	3 мин

N - количество ПЦР циклов для каждого из образцов <S>1, <S>2, и <S>3, как показано в Табл. 1 для определенного количества РНК, использованного на старте синтеза первой цепи.

Таблица 1.

Количество циклов ПЦР для предварительной амплификации

Количество тотальной РНК	Количество полиА+ РНК	Циклов ПЦР для образца		
		<S>1	<S>2	<S>3
2.0 мкг	0.5-1.0 мкг	13-14	16-17	18-20
1.0-2.0 мкг	0.25-0.5 мкг	14-15	17-18	20-21
0.5-1.0 мкг	0.1-0.25 мкг	15-16	18-19	21-22
0.25-0.5 мкг	0.1 мкг	17-18	20-21	23-24

6) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 0.1 мкг 1 т.п.н. ДНК- маркера.

► ПЦР можно хранить при -20°C до трех месяцев и более. Перед нанесением продукта ПЦР на гель после хранения и размораживания, прогрейте его при 72°C в течение 1 мин и перемешайте содержимое пробирки.

7) Сравните результат гель-электрофореза с приведенным на рис. 2. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца исходя из следующих рекомендаций:

- Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция вышла на плато. Оптимальное для амплификации образца количество циклов должно быть на 1-2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато.

- При оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при анализе на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики:

(а) шмер умеренной интенсивности ожидаемой длины
Для кДНК млекопитающих общая интенсивность шмера должна примерно соответствовать той, которую имеют образцы

кДНК, показанные дорожках 2-3 на рис. 2 (сравнение относительно интенсивности маркера). Если интенсивность шмера не нарастает с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4 рис. 2), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации. Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1 рис. 2), значит, количество циклов ПЦР было недостаточно для амплификации этого образца.

- ▶ Как правило, распределение длин молекул в образце дц-кДНК примерно соответствует распределению длин в образце исходной РНК. Для большинства образцов из тканей млекопитающих кДНК, обогащенная полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0.5 до 6 т.п.н. кДНК из других организмов может иметь меньший размер, например до 3 т.п.н. (рис. 3).

(б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

На рис. 2 приведен результат амплификации кДНК из мозга человека. Вследствие высокой сложности полиА⁺ фракции мозговой РНК, эта кДНК не имеет ярких полос. Сходный паттерн имеет кДНК из селезенки и вилочковой железы (тимуса). кДНК из других тканей, как правило, имеет несколько ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам (рис. 3).

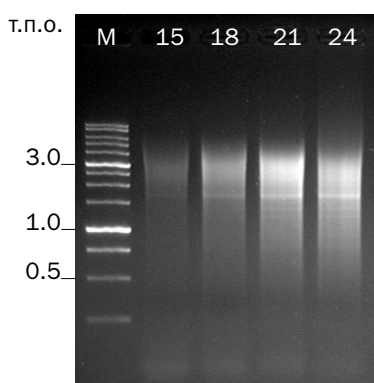


Рис. 2. Результат гель-электрофореза на агарозе (1.2%) амплифицированной дц-кДНК, полученной с помощью набора Mint с контрольной РНК из мозга человека. Количество циклов ПЦР указано над дорожками. М - маркер длин ДНК (1 kb DNA ladder, СибЭнзим, Россия).

В этом эксперименте на старт синтеза первой цепи кДНК был взят 1 мкг контрольной тотальной РНК. По 4 мкл продукта ПЦР было нанесено на 1.2% агарозный гель после 15, 18, 21 и 24 циклов ПЦР параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. В приведенном

эксперименте после 21 цикла ПЦР в продукте ПЦР наблюдается появление высокомолекулярной фракции, что свидетельствует об избыточной амплификации. Так как реакция выходит на плато после 20 циклов ПЦР, оптимальным для амплификации данного образца является использование 18-19 циклов ПЦР.

Шмер, частично смещенный к лунке, с размытыми или отсутствующими характеристическими полосами, свидетельствует об избыточной амплификации образца кДНК.

Слабовыраженные полосы на фоне малоинтенсивного шмера свидетельствует о недостаточном количестве циклов ПЦР.

Если Вы сочли, что все образцы (<S>1-<S>3) были подвергнуты недостаточному количеству циклов ПЦР, добавьте 2-3 дополнительных цикла и повторите анализ на гель-электрофорезе.

- ▶ Репрезентативность образца амплифицированной кДНК зависит от количества молекул кДНК, взятых на старт амплификации. Следовательно, чем меньше молекул попало в реакционную смесь, тем больше циклов ПЦР потребуется для амплификации необходимого количества кДНК. Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов.

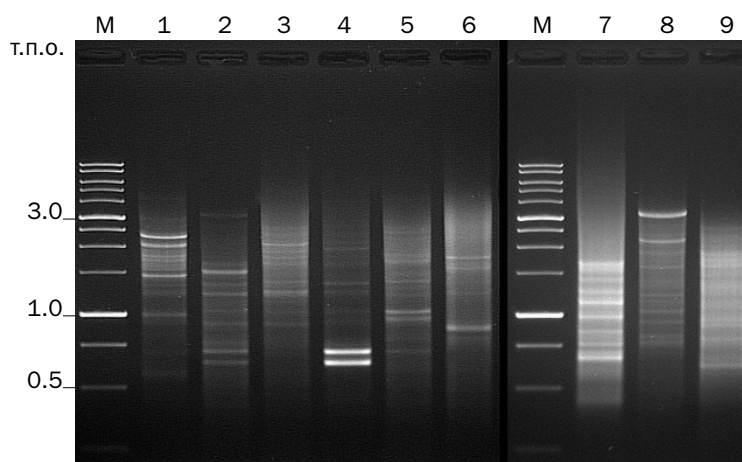


Рис. 3. Результат гель-электрофореза на агарозе (1.2%) образцов кДНК из различных источников, приготовленных с помощью набора Mint:

(1) - печень мыши; (2) - скелетная мышца мыши; (3) - мозг мыши; (4) - лейкоциты человека; (5) - легкое человека; (6) - скелетная мышца человека; (7) - личинка комара; (8) - копепода *Pontella sp.*; (9) - лист томата *Lycopersicon esculentum*. М - маркер длин ДНК (1 kb DNA ladder, СибЭнзим, Россия).

VI.2.2. Препаративная наработка дц-кДНК

- 1) Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке*:

VI Протокол синтеза кДНК

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 мМ)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 мМ)
1 мкл	50X Encyclo полимераза
<hr/>	
49 мкл	Суммарный объем

- ▶ * Приведенные количества указаны для амплификации одного образца первой цепи кДНК в объеме 50 мкл. В этом объеме возможно наработать 200-500 нгр кДНК. Определите, какое количество дц-кДНК необходимо для дальнейшей работы. Обычно, при оптимальных условиях, амплифицированный образец имеет концентрацию кДНК 5-10 нгр/мкл.
 - ▶ При использовании иного объема ПЦР или при приготовлении общей реакционной смеси для нескольких образцов количество компонентов необходимо пропорционально увеличить. Необходимо учесть возможные потери на 20-30% при очистке продукта ПЦР.
- 2) Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 - 3) Распределите реакционную смесь по 49 мкл в отдельные 0.2-мл или 0.5-мл пробирки для ПЦР.
 - 4) Добавьте по 1 мкл первой цепи кДНК (со стадии VI.1.10) к каждой реакционной смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.
 - ▶ Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, хранившийся при -20°C , должен быть прогрет при 65°C мин и перемешан встряхиванием.
 - ▶ Сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на -20°C .
 - 5) Если Ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.
 - 6) Осуществите амплификацию, используя следующую инструкцию:

Предварительная денатурация	1 цикл	95°C	1 мин
		95°C	15 сек
Циклы ПЦР	N* циклов	66°C	20 сек
		72°C	3 мин
Финальная элонгация	1 цикл	66°C	20 сек
		72°C	3 мин

N - количество ПЦР циклов, определенное как оптимальное для данного образца как описано в разделе "Предварительная аналитическая амплификация".

7) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку). Используйте 50-100 нг 1 kb ДНК-маркера.

Продукт ПЦР можно хранить при -20°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

- ▶ *Продукт ПЦР может быть использован для ненаправленного клонирования библиотеки кДНК в TA-вектор (например в pAL2-T вектор, Евроген кат. TA002). Для эффективного лигирования свежий продукт ПЦР необходимо быстро очистить с помощью специальных коммерческих наборов или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом. Для лигирования в TA-вектора использовать только свежеприготовленную кДНК.*
- ▶ *После хранения реакционной смеси в холодильнике её можно клонировать по "тупым концам" в любой вектор. Для клонирования по "тупым концам" следует провести процедуру "полировки" (polishing).*
- ▶ *Полученная кДНК может быть также использована для псевдо-Нозерн блота, супрессионной вычитающей гибридизации (см. протокол Clontech SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, PT3041-1, Section VIII. Protocol for PCR-Select™ cDNA Subtraction), для кДНК нормализации с помощью набора Trimmer-2 (Евроген, кат.# NK003) или как матрица для ПЦР.*

VII. Возможные трудности и их решение

1. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в положительном контроле

Возможная причина проблемы	Варианты решения
РНК могла деградировать во время хранения или реакции синтеза первой цепи	Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Убедитесь, что ваши реагенты, рабочая зона и инструментарий не загрязнены нуклеазами. Проверьте качество РНК на денатурирующем гель-электрофорезе. Если Вы подозреваете, что проблема - деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) как указано в разделе: "Предварительная аналитическая амплификация".
Ошибка в процессе работы	Проверьте не была ли допущена ошибка в процессе работы. Повторите синтез кДНК, используя новую порцию контрольной РНК. Убедитесь, что РНК была прогрета и перемешана перед взятием аликвоты.
Использованы субоптимальные параметры ПЦР	Оптимальные параметры ПЦР зависят от амплификатора, времени хранения ферментов, природы РНК. Если ПЦР выходит на плато через 25 циклов и более, возможно, Вы используете неоптимальные параметры ПЦР. Осуществите оптимизацию параметров ПЦР (Раздел "Возможные трудности и их решение: Оптимизация параметров ПЦР") и повторите амплификацию, используя новую порцию первой цепи кДНК. Если Вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: customer-support@evrogen.ru

2. Оптимизация параметров ПЦР

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Слишком высокая температура отжига	Постепенно снижайте температуру отжига с шагом 2-4°C.
Слишком высокая или низкая температура денатурации	Постепенно снижайте/увеличивайте температуру денатурации с шагом 1°C.

3. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в экспериментальных образцах. В то же время в контроле - хорошее качество ПЦР

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Экспериментальная РНК деградирована или имеет низкую концентрацию	<p>Проверьте качество и концентрацию РНК на денатурирующем гель-электрофореze.</p> <p>Проверьте стабильность РНК, инкубируя аликвоту РНК при 42°C в течение 1 ч, после чего проверьте её качество на гель-электрофореze, сравнив с неинкубированной РНК.</p> <p>Если РНК деградировала во время инкубации, повторите выделение РНК другим методом или проведите дополнительную очистку РНК с помощью нескольких последовательных экстракций фенолом - хлороформом.</p> <p>Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК.</p> <p>Если Вы подозреваете, что проблема - деградация РНК в ходе синтеза кДНК, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РН-Каз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) как указано в разделе "Предварительная аналитическая амплификация".</p>
Образцы РНК могут содержать нежелательные добавки, ингибирующие синтез кДНК	В ряде случаев переосаждение РНК этанолом или LiCl позволяет избавиться от нежелательных примесей. Если переосаждение не помогает, используйте иной метод выделения РНК.

4. Продукт ПЦР хорошего качества, но низкой концентрации

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Недостаточно число циклов ПЦР	<p>Увеличьте число циклов ПЦР, добавив 2-3 дополнительных цикла (плюс финальная элонгация). Если увеличение количества циклов не приводит к увеличению выхода ПЦР, повторите амплификацию, изменив количество первой цепи (уменьшить или увеличить в 2 раза). Если концентрация продукта ПЦР остается недостаточной, повторите синтез первой цепи, используя большее количество РНК на старте.</p> <p>▶ Если амплификация образца кДНК требует более 25 циклов, такой образец может не содержать редких транскриптов.</p>

5. При анализе на гель-электрофорезе отсутствуют яркие полосы, соответствующие частым транскриптам

Возможная причина проблемы	Варианты решения
Избыточное число циклов ПЦР	<p>Повторите ПЦР со свежей порцией первой цепи кДНК, уменьшив число циклов на 2-3.</p> <p>▶ Анализ кДНК из некоторых тканей (например, мозг, тимус, селезенка млекопитающих) может не выявлять ярких полос</p>
Неправильные параметры электрофореза	<p>Степень визуализации кДНК может зависеть от параметров гель-электрофореза. Используйте следующие параметры: 1X TAE буфер, концентрация агарозы 1.1%-1.5%, рабочее напряжение не более 10 V/см (10V на каждый см длины между электродами).</p>

VIII. Приложение А

Рекомендации по проведению неденатурирующего гель-электрофореза РНК

1) Рекомендуемые условия:

- используйте 1X TAE буфер (не 1X TBE),
- используйте агарозу в концентрации 1.1%-1.2%,
- добавляйте бромистый этидий (EtBr) в гель и буфер для электрофореза, избегайте дополнительных стадий окрашивания,
- используйте только свежеприготовленный гель и буфер, а также чистое оборудование для электрофореза,
- используйте перчатки при постановке электрофореза,
- используйте рабочее напряжение не более 10 V/см (10V на каждый см длины между электродами).

2) Перед нанесением аликвот РНК на гель, прогрейте их при 70°C в течение 1 мин и поместите на лед.

3) Наносите параллельно с тестируемыми образцами известное количество маркера длин ДНК или РНК как стандарта для определения концентрации РНК. Концентрация тотальной РНК может быть грубо оценена по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК, так как инкорпорация EtBr в рРНК и ДНК имеет сходную эффективность.

4) Первым признаком деградации РНК на неденатурирующем гель-электрофорезе служит появление слабого шмера от полос рРНК в сторону фронта и изменение соотношения интенсивности полос 28S/18S рРНК в пользу 18S. РНК с такой степенью деградации может быть использована для синтеза кДНК для большинства приложений. Однако, если шмер от низкомолекулярной фракции РНК столь интенсивен, что полоса рРНК не имеет выраженной нижней границы, то такая РНК не пригодна для синтеза кДНК.

Список литературы

- [1] Franz, Bruchhaus и Roeder. (1999) *Nucleic Acids Res*, 27 (11): e3 / pmid: 10325436.
- [2] Diatchenko и др. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (12): 6025—6030 / pmid: 8650213.
- [3] Diatchenko и др. (1999) *Methods Enzymol*, 303: 349—380 / pmid: 10349654.
- [4] Zhulidov и др. (2004) *Nucleic Acids Res*, 32 (3): e37 / pmid: 14973331.
- [5] Zhulidov и др. (2005) *Bioorg Khim.* 31 (2): 186—194 / pmid: 15889793.
- [6] Schmidt и Mueller. (1999) *Nucleic Acids Res*, 27 (21): e31 / pmid: 10518626.
- [7] Sambrook, Fritsch и Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [8] Ishikawa. (1977) *Comp Biochem Physiol B*, 58 (1): 1—7 / pmid: 400949.

Для заметок

Продукты и услуги компании Евроген

P – продукты

S – услуги

Молекулярная биология

Выделение и очистка нуклеиновых кислот, маркеры длин ДНК **P**

ПЦР, синтез кДНК и RACE **P**

Клонирование ДНК **P**

Нормализация кДНК **P S**

Учебные наборы **P**

Синтез олигонуклеотидов и секвенирование **S**

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**

Синтез генов и направленный мутагенез **S**

Приготовление библиотек кДНК **S**

Сложные сервисы **S**

Клеточная биология

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция и создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Конструирование лентивирусных частиц **S**

Лентивирусные конструкции для РНК-интерференции **S**

Молекулярная медицина

Наборы для детекции мутаций в протоонкогенах **P**

Услуги в области молекулярной онкологии **S**

Услуги в области молекулярной генетики наследственных заболеваний **S**

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

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус
70 (Технопарк ИБХ)
Тел.: +7 (495) 988-4083
Факс: +7 (495) 988-4085
www.evrogen.ru
order@evrogen.ru