

Mint kit

Набор реактивов для синтеза двухцепочечной кДНК

Номер по каталогу:
SK001 — на 20 реакций

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	4
2. Состав	4
3. Условия хранения и транспортировки	4
4. Количество реакций	4
5. Метод	5
6. Основные характеристики	5
7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы	7
8. Биологический материал	7
9. Протокол	8
10. Возможные проблемы и способы их решения	13

1. Назначение

Набор реактивов Mint kit предназначен для синтеза обогащенной полно-размерными последовательностями двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) на матрице поли(А) или тотальной РНК.

Полученная дц-кДНК может быть использована для нормализации кДНК с помощью набора реактивов Trimmer-2 (кат. # NK003, Евроген) и быстрой амплификации 5'- и 3'-концевых фрагментов транскриптов с помощью технологии Step-Out RACE.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Состав

Компоненты набора	Количество
Mint Reverse Transcriptase	20 µl
5X First strand buffer	80 µl
DTT (20 mM)	30 µl
dNTP mix (10 mM each)	80 µl
PlugOligo-1 adapter (15 µM)	25 µl
CDS-1 adapter (10 µM)	25 µl
IP-solution	130 µl
Control total RNA (0.5 µg/µl)	15 µl
PCR M1 Primer (10 µM)	100 µl
50X Encyclo polymerase mix	50 µl
10X Encyclo buffer	300 µl
Deionized water, nuclease-free	1.5 ml

3. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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

4. Количество реакций

Набор рассчитан на 20 реакций.

5. Метод

В основе метода синтеза дц-кДНК лежит свойство Mint ревертазы добавлять нематрично на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков, преимущественно dC. Схема метода приведена на Рисунке 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.

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.

Первую цепь кДНК амплифицируют в ПЦР с праймером M1, соответствующим внешней части PlugOligo и 3'-праймера. Использование Encyclo полимеразы 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.

6. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Оптимальная температура работы	42 °C
Максимальная длина синтезируемой дц-кДНК	До 5 т.п.о.*
Количество биоматериала	250 нг – 2 мкг тотальной РНК 100 нг – 1 мкг поли(А) РНК
Активность РНКазы N	Отсутствует

* При условии использования РНК высокого качества (параметры качественной РНК см. в п.8).

Название	Последовательность
PlugOligo-1 adapter (15 μM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-P-3'
CDS-1 adapter (10 μM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN-3'
PCR M1 Primer (10 μM)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Сайт эндонуклеазы рестрикции RsaI подчеркнут; N = A, C, G или T; V = A, G или C.

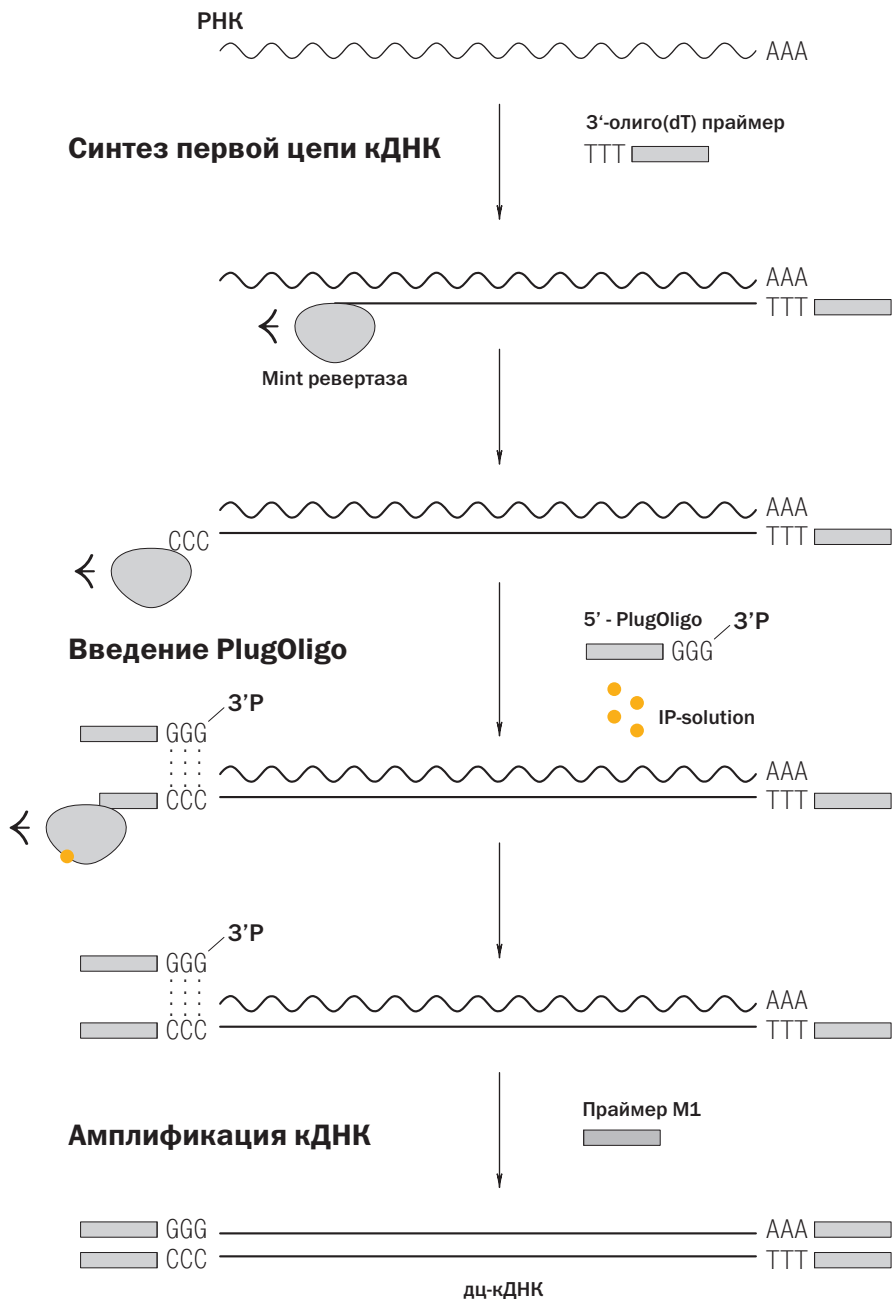


Рисунок 1 — схема синтеза дц-кДНК с использованием набора реактивов Mint kit.

При использовании низкокачественной РНК в реакцию необходимо добавить IP-solution.

7. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Твёрдотельный термостат.
- Амплификатор.
- Вортекс.
- Автоматические дозаторы на 2, 10, 20 и 200 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 или 2 мл.
- Пробирки для ПЦР, совместимые с амплификатором.

8. Биологический материал

Минимальное стартовое количество РНК для синтеза первой цепи кДНК составляет 250 нг тотальной или 100 нг поли(А) РНК. Для достижения наилучшего результата рекомендуется использовать 1–2 мкг тотальной РНК или 0.5–1 мкг поли(А) РНК.

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

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

После выделения РНК рекомендуется провести оценку ее качества с помощью гель-электрофореза в агарозном геле.

РНК, пригодная для синтеза кДНК, имеет следующие характеристики:

- Тотальная РНК из тканей млекопитающих на агарозном геле выглядит как 2–3 четкие полосы. В зависимости от метода выделения короткоцепочечные формы РНК (5S, 5.8S, тРНК) могут отсутствовать. Верхние полосы 28S и 18S рибосомальной РНК имеют подвижность приблизительно соответствующую подвижности фрагментов ДНК длиной 4.5 и 1.9 т.п.о. Соотношение интенсивности полос 28S к 18S рРНК должно быть в интервале 1.5–2.5 к 1. Изменение соотношения в пользу 18S рРНК свидетельствует о частичной деградации выделенной РНК.
- поли(А) РНК млекопитающих выглядит как шмер от 0.1 до 4–7 т.п.о., содержащий слабовыраженные 28S и 18S полосы.
- РНК из других организмов может иметь иные характеристики: количество полос и их подвижность могут отличаться.

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.

9. Протокол

Общее время работы: 1.5 часа.

Внимание! Все манипуляции с РНК проводить в зоне, свободной от РНКаз. Во время работы использовать перчатки, наконечники с фильтром и другой лабораторный пластик, свободный от РНКаз.

В процессе работы РНК и компоненты набора держать на льду.

Рекомендации по проведению синтеза кДНК: при подборе и оптимизации условий синтеза кДНК используйте образец ПКО, входящий в состав набора (Control total RNA), в количестве 1 мкл в реакцию.

9.1. Синтез первой цепи кДНК и введение PlugOligo

1. Для каждого образца РНК смешайте в пробирке следующие компоненты:

РНК:	250 нг – 2 мкг тотальной РНК или 100 нг – 1 мкг поли(А) РНК;
Праймер:	1 мкл CDS-1 adapter (10 μ M);
Адаптер:	1 мкл PlugOligo-1 (15 μ M);
Вода:	Доведите объем до 5 мкл водой (Deionized water, nuclease-free).

► Для предотвращения агрегации РНК, перед взятием аликвот прогрейте образцы РНК при 65 °С в течение 1–2 минут, перемешайте содержимое и сбросьте капли со стенок пробирки на мини-центрифуге.

2. Прогрейте смесь 2 минуты при 70 °С, перенесите образцы в лед.

3. Добавьте 5 мкл предварительно подготовленной смеси:

2 мкл	5X First strand buffer;
1 мкл	dNTP mix (10 mM each);
1 мкл	DTT (20 mM);
1 мкл	Mint Reverse Transcriptase (добавить в последнюю очередь!).

► Рекомендуется добавить в реакционную смесь 0.5 мкл ингибитора РНКаз (например, Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген).

4. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.

5. Проведите инкубацию:

42 °С — от 50 минут до 2 часов;

70 °С — 10 минут, после чего охладить во льду.

ВНИМАНИЕ! Если РНК низкого качества (признаки деградации, присутствуют ингибиторы), то проведите инкубацию по протоколу:

42 °C — 20 минут;

добавьте в каждую пробирку по 5 мкл IP-solution;

42 °C — от 30 минут до 1.5 часов;

70 °C — 10 минут, после чего охладить во льду.

- ▶ Для сохранения объема реакции рекомендуется добавлять минеральное масло для ПЦР (15–20 мкл) и/или использовать амплификатор с нагревающейся крышкой.
- ▶ 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 или храниться при –20 °C в течение 1 месяца. После размораживания кДНК перед использованием прогрейте образец при 65 °C в течение 1 минуты, перемешайте содержимое пробирки.

9.2. Амплификация кДНК

Рекомендации по проведению амплификации кДНК (синтез дц-кДНК):

- определите оптимальное количество циклов ПЦР для амплификации кДНК. Избыточное количество циклов приводит к накоплению неспецифического продукта и может существенно искажать результаты эксперимента. Недостаточное количество циклов приводит к небольшому количеству продуктов амплификации дц-кДНК;
- для контроля прохождения реакции используйте кДНК, полученную с образца ПКО (Control total RNA) на первом этапе.

9.2.1. Предварительная аналитическая амплификация

- ▶ Предварительная аналитическая амплификация необходима для подбора оптимального количества кДНК в реакции и количества циклов ПЦР.

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь:

40 мкл	Deionized water, nuclease-free;
5 мкл	10X Encyclo buffer;
1 мкл	dNTP mix (10 mM each);
2 мкл	PCR M1 Primer (10 µM);
1 мкл	50X Encyclo polymerase mix;
1 мкл	Первая цепь кДНК.

2. Перемешайте смесь пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.

3. Разделите реакционную смесь на 3 аликвоты по 16 мкл (S1–S3) в пробирки для ПЦР.

4. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °С	1 мин
Денатурация	N циклов*	95 °С	15 с
Отжиг		66 °С	20 с
Элонгация		72 °С	3 мин

* Каждая аликвота (S1–S3) должна быть амплифицирована на разных циклах. Количество циклов определяется исходя из типа исходной РНК и ее количества в реакции синтеза кДНК (см. Таблицу 1).

Таблица 1 — количество циклов ПЦР для предварительной амплификации.

Количество тотальной РНК*	Количество поли(А) РНК*	Количество циклов ПЦР для образца		
		S1	S2	S3
2.0 мкг	0.5–1.0 мкг	13–14	16–17	19–20
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

* Указано количество РНК, которое использовалось для синтеза первой цепи кДНК.

5. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку, в качестве маркера длин используйте 100 нг DNA ladder 1kb (кат. # NL001, Евроген)).

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

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

(а) шмер умеренной интенсивности ожидаемой длины

Для дц-кДНК млекопитающих общая интенсивность шмера должна примерно соответствовать той, которую имеют образцы дц-кДНК, показанные на дорожках 2–3, Рисунок 2 (сравнение относительно интенсивности маркера).

Если интенсивность шмера не нарастает с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4, Рисунок 2), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации.

Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1, Рисунок 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 дц-кДНК, обогащенная полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0.5 до 6 т.п.о. дц-кДНК из других организмов может иметь меньший размер, например, до 3 т.п.о. (Рисунок 3).

(б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

При подозрении, что все образцы были подвергнуты недостаточному количеству циклов ПЦР, добавьте 2–3 дополнительных цикла и повторите анализ на гель-электрофорезе.

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

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

Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов.

На Рисунке 2 приведен результат амплификации кДНК из мозга мыши.

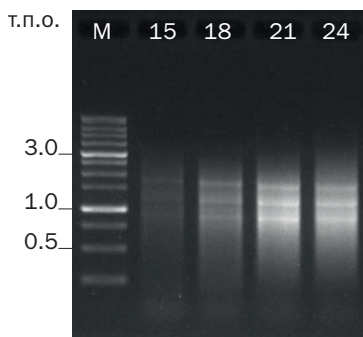


Рисунок 2 — результат гель-электрофореза (1.2% агароза) амплифицированной дц-кДНК с РНК из мозга мыши.

Количество циклов ПЦР указано над дорожками.

М — маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген). После 21 цикла 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.

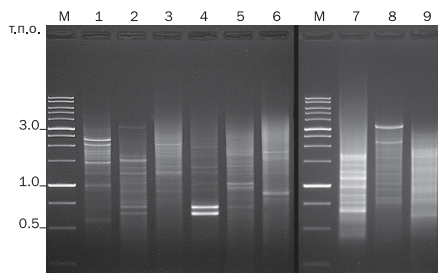


Рисунок 3 — результат геле-электрофореза (1.2 % агароза) образцов дц-кДНК из различных источников, приготовленных с помощью набора Mint kit:

(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 DNA ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген).

9.2.2. Препаративная наработка дц-кДНК

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь:

- 40 мкл Deionized water, nuclease-free;
- 5 мкл 10X Encyclo buffer;
- 1 мкл dNTP mix (10 mM each);
- 2 мкл PCR M1 Primer (10 μ M);
- 1 мкл 50X Encyclo polymerase mix.

2. Аккуратно перемешайте реакционную смесь на вортексе, сбросьте капли кратким центрифугированием.

3. Разнесите по 49 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

4. Внесите по 1 мкл первой цепи кДНК к каждой реакционной смеси. Перемешайте содержимое пробирок пипетированием, сбросьте капли на мини-центрифуге.

5. Установите пробирки в амплификатор. Запустите программу, следуя рекомендациям:

Предварительная денатурация	1 цикл	95 °C	1 мин
Денатурация		95 °C	15 с
Отжиг	N циклов*	66 °C	20 с
Элонгация		72 °C	3 мин
Финальная элонгация	1 цикл	66 °C	20 с
		72 °C	3 мин

* Количество циклов определяется исходя из типа исходной РНК и ее количества в реакции синтеза кДНК. Используйте данные, полученные в п. 9.2.1 «Предварительная аналитическая амплификация».

6. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР (дц-кДНК) с помощью геле-электрофореза (1.2% агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку). Используйте 100 нг DNA ladder 1 kb (кат. # NL001, Евроген).

дц-кДНК можно хранить при -20°C в течение 6 месяцев. Полученная дц-кДНК может быть использована для нормализации с помощью Trimmer-2 (кат. # NK003, Евроген) и быстрой амплификации 5'- и 3'-концевых фрагментов транскриптов с помощью технологии Step-Out RACE.

10. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой или продукт ПЦР отсутствует в положительном контроле.	1. РНК могла деградировать во время хранения или реакции синтеза первой цепи.	1. Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Убедитесь, что ваши реагенты, рабочая зона и инструментарий не загрязнены нуклеазами. Проверьте качество РНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Если Вы подозреваете, что проблема — деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. № EK005S/M, Евроген) как указано в разделе: "Предварительная аналитическая амплификация".
	2. Ошибка в процессе работы.	2. 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.
	3. Использованы субоптимальные параметры ПЦР.	3. 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: support@evrogen.ru.
2. Оптимизация параметров ПЦР.	1. Слишком высокая температура отжига. 2. Слишком высокая или низкая температура денатурации.	1. Постепенно снижайте температуру отжига с шагом 2–4 °С. 2. Постепенно снижайте/увеличивайте температуру денатурации с шагом 1 °С.

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
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.	1. Экспериментальная РНК деградирована или имеет низкую концентрацию. 2. Образцы РНК могут содержать нежелательные добавки, ингибирующие синтез кДНК.	1. Проверьте качество и концентрацию РНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверьте стабильность РНК, инкубируя аликвоту РНК при 42 °С в течение 1 ч, после чего проверьте ее качество на гель-электрофорезе, сравнив с неинкубированной РНК. Если РНК деградировала во время инкубации, повторите выделение РНК другим методом или проведите дополнительную очистку РНК с помощью нескольких последовательных экстракций фенолом-хлороформом. Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК. Если Вы подозреваете, что проблема — деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (Ингибитор РНКаз RiboCare, кат. ## EK005S/M, Евроген) как указано в разделе: "Предварительная аналитическая амплификация". 2. 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.	Недостаточное число циклов ПЦР.	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. ► Если амплификация образца кДНК требует более 25 циклов, такой образец может не содержать редких транскриптов.

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
5. При анализе на гель-электрофорезе отсутствуют яркие полосы, соответствующие частым транскриптам.	1. Избыточное число циклов ПЦР.	1. Повторите ПЦР со свежей порцией первой цепи кДНК, уменьшив число циклов на 2–3. ▶ Анализ дц-кДНК из некоторых тканей (например, мозг, тимус, селезенка млекопитающих) может не выявлять ярких полос.
	2. Неправильные параметры электрофореза.	2. Степень визуализации дц-кДНК может зависеть от параметров гель-электрофореза. Используйте следующие параметры: 1X TAE буфер, концентрация агарозы 1.1% – 1.5%, рабочее напряжение не более 10 В/см (10 В на каждый см длины между электродами).

Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
BC032	Реагент ExtractRNA	на 100 выделений из 100 мг ткани
EK005S	Ингибитор РНКаз RiboCare	50 реакций
EK005M		250 реакций
NK003	Набор для нормализации кДНК Trimmer-2	10 реакций
NL001	Маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb	40 мкг
PB022	50X TAE буфер	100 мл
PB122		1 л

Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу
НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот    

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ   

Синтез и амплификация кДНК      

Клонирование ДНК      

Выявление контаминации микоплазмой    

Оценка ДНК    

Нормализация кДНК      

Практикум по генной инженерии    

Генотипирование    

Синтез олигонуклеотидов и зондов    

Секвенирование по Сэнгеру    

Синтез генов    

Сайт-направленный мутагенез    

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