



# OneTube RT-PCRmix

Готовая смесь для одноэтапного анализа РНК методом ОТ-ПЦР

SK101S – на 100 реакций по 25 мкл

SK101M – на 500 реакций по 25 мкл

Инструкция по применению

## Содержание

1. Назначение . . . . .	3
2. Преимущества OneTube RT-PCRmix . . . . .	4
3. Состав . . . . .	4
4. Приборы для выполнения анализа . . . . .	5
5. Рекомендации по подбору условий реакции . . . . .	5
5.1. Подбор праймеров . . . . .	5
5.2. Расчет температуры отжига праймеров . . . . .	6
5.3. Подготовка анализируемых образцов (РНК/ДНК) . . . . .	6
6. Протокол . . . . .	6
6.1. Контроли . . . . .	6
6.2. Подготовка олигонуклеотидов . . . . .	7
6.3. Подготовка реакционной смеси . . . . .	7
6.4. Амплификация . . . . .	8
7. Анализ результатов . . . . .	9
7.1. Анализ реакции «NTC» . . . . .	9
7.2. Анализ исследуемых образцов . . . . .	9
7.3. Особенности анализа РНК эукариот . . . . .	9

# 1. Назначение

Реакционная смесь OneTube RT-PCRmix предназначена для одноэтапного получения комплементарной ДНК (кДНК) и ПЦР-анализа в реальном времени. Синтез кДНК и ПЦР выполняются последовательно в одной пробирке за счет смены режима температур.

Протокол позволяет одновременно с РНК анализировать ДНК в пробе.

Этот формат удобен для определения в одной пробе РНК- и ДНК-содержащих вирусов и для количественной оценки нуклеиновых кислот (НК).

Для постановки анализа используют специфические праймеры и универсальный ОТ-ПЦР протокол. Детекция возможна с помощью специфического зонда к выбранной мишени или интеркалирующего красителя. В последнем случае требуется анализ кривых плавления.

OneTube RT-PCRmix обеспечивает возможность быстро и надежно проанализировать большое количество проб в высокопроизводительных рабочих процессах.

Продукт	Кат. #	Объем	Кол-во реакций по 25 мкл / по 15 мкл
OneTube RT-PCRmix	SK101S	600 мкл	100 / 150
	SK101M	3 мл (5 × 600 мкл)	500 / 750

**Хранение и транспортировка:** –20 °С, не более 10 циклов замораживания-размораживания.

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки – 12 месяцев со дня поставки.

С готовой смесью OneTube RT-PCRmix могут применяться следующие продукты:

- **25X HighROX** или **25X LowROX** (кат. ## PB223 и PB224, Евроген).
- **50X SYBR Green I для ПЦР-РВ** (кат. # PB025S/M, Евроген)
- **Стерильная вода, свободная от нуклеаз** (кат. # PB007, Евроген)

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

## 2. Преимущества OneTube RT-PCRmix

- Упрощенный протокол анализа НК в одной пробирке позволяет быстро и легко обработать одновременно большое количество образцов.
- Снижена вероятность контаминации по сравнению с использованием двустадийного протокола синтеза кДНК и ПЦР.
- OneTube RT-PCRmix может применяться в мультиплексной ПЦР для одновременного анализа целевых мишеней и внешнего или эндогенного внутренних контролей.
- Протокол позволяет увеличить объем анализируемого образца в реакции до 17 мкл, что повышает чувствительность анализа для низкокопийных мишеней/мишеней с низким титром.
- Увеличенная специфичность смеси OneTube RT-PCRmix обеспечена за счет использования термостабильной ревертазы (устойчива до +55 °С) и «горячего старта» амплификации.
- Смесь OneTube RT-PCRmix устойчива к ингибиторам ПЦР в концентрациях, которые могут оказаться в пробе при рутинном выделении НК. Благодаря этому обеспечиваются воспроизводимые результаты даже со сложными образцами, содержащими небольшие примеси ингибиторов ПЦР. На реакцию практически не влияют: этанол – до 3.5%, гуанидин тиоцианат – до 40 мМ, ЭДТА – до 1.5 мМ.
- В одном анализе могут определяться мишени как РНК, так и ДНК. При этом применяется один и тот же протокол ОТ-ПЦР. В одной пробе можно определять РНК- и ДНК-содержащие вирусы, оценить качество анализируемого материала (например, контроль взятия пробы по наличию геномной ДНК), выполнить качественную и количественную оценку НК.
- Гибкость при выборе метода детекции амплифицированного продукта. Кроме флуоресцентных зондов можно применять интеркалирующие красители.

## 3. Состав

В состав смеси входит модифицированная термоустойчивая MMLV ревертаза, Taq ДНК-полимераза с «горячим стартом», обеспеченным моноклональными антителами, смесь dNTP, Mg<sup>2+</sup>, ПЦР буфер.

### Свойства ревертазы

- Модифицированная MMLV-ревертаза
- Обладает высокой процессивностью и точностью синтеза кДНК
- Лишена активности РНКазы Н
- Сохраняет активность при +55 °С, инактивируется при +95 °С.

## Свойства Taq ДНК-полимеразы

- 5'→3' полимеразная активность
- 5'→3' экзонуклеазная активность
- «Горячий старт» в первом цикле денатурации (+95 °С, 5-10 секунд). На этапе синтеза первой цепи кДНК полимеразы инактивирована.

## 4. Приборы для выполнения анализа

Подходит для Real-Time амплификаторов любого типа.

Если протокол амплификации требует добавления в реакцию смесь референсного красителя ROX, рекомендуем [25X HighROX](#) или [25X LowROX](#) (кат. ## PB223 и PB224) в зависимости от типа прибора.

## 5. Рекомендации по подбору условий реакции

Рекомендуемая длина ампликонов – до 300 п.о.

### 5.1. Подбор праймеров

Для анализа используются ген-специфичные праймеры.

Использование случайных или олиго(dT) праймеров не рекомендуется во избежание амплификации неспецифических продуктов.

**При анализе экспрессии РНК эукариот** место посадки затравочного праймера для синтеза кДНК лучше расположить на стыке экзонов (см. рис. 1 на стр. 10 – вариант 3). Это увеличивает специфическую амплификацию кДНК.

При расположении обоих праймеров на стыке экзонов геномная ДНК не детектируется.

Расположение праймеров на разных экзонах (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, образцы РНК рекомендуется обработать ДНКазой, свободной от РНКаз (в набор не входит).

**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.

## 5.2. Расчет температуры отжига праймеров

Температура отжига ( $T_m$ ) определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета температуры отжига можно воспользоваться формулой:

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

Оптимальная  $T_m$  может отличаться от расчетной. Рекомендуется точно определить ее, используя градиент температур. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов ( $T_m + 5 \text{°C}$ ) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

## 5.3. Подготовка анализируемых образцов (РНК/ДНК)

Для получения воспроизводимых результатов необходимо стандартизировать выделение проб нуклеиновых кислот. Проба должна быть растворена в воде, свободной от РНКаз.

**ВНИМАНИЕ!** ЕСЛИ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПОСЛЕ ВЫДЕЛЕНИЯ БЫЛИ РАСТВОРены В ТЕ, ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕ БОЛЕЕ 3 мкл выделенной НК НА РЕАКЦИЮ.

Рекомендуемое количество РНК до 300 нг на реакцию.

При анализе вирусов допустимое содержание в пробе геномной ДНК не более 10 нг/мкл.

Для РНК-содержащих вирусов (на примере лентивирусов) показана надежная детекция от 10 вирусных частиц в образце.

Для выделения РНК можно воспользоваться следующими наборами Евроген или их аналогами:

- **Реагент ExtractRNA** (кат. # BC032) – для выделения суммарной РНК из любого биологического материала (в том числе из мягких и твердых тканей).
- **CleanRNA Standard** (кат. # BC033) – для выделения на колонках РНК/ДНК (в том числе вирусной) из мазков и соскобов.

## 6. Протокол

### 6.1. Контроли

В постановку анализа всегда необходимо включать как минимум два контрольных образца:

- Отрицательный контроль без матрицы «NTC» – реакция для проверки чистоты реактивов от примесей НК. В качестве NTC используется вода или буфер, в котором были растворены образцы НК.
- Положительный контроль – образец РНК/ДНК, на котором ранее были отработаны условия реакции.

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

## 6.2. Подготовка олигонуклеотидов

Для надежного и высокопроизводительного анализа проб НК рекомендуется предварительно подобрать оптимальное соотношение праймеров и зонда в реакции. Затем приготовить концентрированную смесь олигонуклеотидов (олиго-премикс). Смесь олигонуклеотидов можно хранить при +4 °С до 1 месяца или размораживать перед каждой постановкой.

**ВНИМАНИЕ!** в олиго-премикс допускается добавлять красители ROX и SYBR GREEN I. НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ХРАНЕНИЕ SYBR GREEN I в водном растворе более 7 дней при температуре +4 °С.

Предварительная подготовка олиго-премиксов значительно увеличивает производительность анализа, снижает вероятность ошибки и делает реакцию более чувствительной за счет увеличения объема анализируемой пробы.

## 6.3. Подготовка реакционной смеси

1. Рассчитайте необходимый объем компонентов, исходя из числа образцов, включая контрольные. Воспользуйтесь для расчета таблицей.

Для каждой используемой мишени необходимо не менее одной реакции без матрицы «НТС» и реакции положительного контроля «ПКО».

**ВНИМАНИЕ!** нельзя изменять пропорцию смеси ONETUBE RT-PCRMIX в реакционной смеси.

Для остальных компонентов приведенные объемы носят рекомендательный характер.

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Количество на 15 мкл реакции	Концентрация в 1X реакционной смеси
OneTube RT-PCRmix	6 мкл	4 мкл	1X
Олиго-премикс: <ul style="list-style-type: none"><li>• Праймер For</li><li>• Праймер Rev</li><li>• Зонд</li><li>• Красители SYBR Green I*, ROX**</li></ul>	2 мкл	1 мкл	0.4-1.0 мМ каждого
Проба нуклеиновой кислоты, вода, свободная от РНКаз*** или буфер, использованный для элюции НК	17 мкл	10 мкл	Не более 300 нг РНК

\* При отсутствии зонда, добавляют 50X SYBR Green I (кат. # PB025) из расчета 0.25 мкл на 25 мкл реакции

\*\* При необходимости включить в состав ROX – 1 мкл на 25 мкл реакции (кат. ## PB223 или PB224).

\*\*\* Для разбавления пробы использовать только воду, свободную от РНКаз (например, кат. # PB007).

2. Разморозьте компоненты реакционной смеси при комнатной температуре.

**ВНИМАНИЕ!** СМЕСЬ ONE TUBE RT-PCR MIX НЕЛЬЗЯ ПРОГРЕВАТЬ ВЫШЕ +37 °С ИЛИ НАДОЛГО ОСТАВЛЯТЬ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ.

3. Тщательно перемешайте размороженные компоненты.

**ВНИМАНИЕ!** СМЕСЬ ONE TUBE RT-PCR MIX ИМЕЕТ ПОВЫШЕННУЮ ВЯЗКОСТЬ. ПЕРЕВЕРНИТЕ ПРОБИРКУ 4-5 РАЗ, ЗАТЕМ ИМПУЛЬСНО ВСТРЯХНИТЕ НА ВЕРТЕКСЕ БЕЗ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕНЫ.

4. Смешайте общие компоненты на нужное количество реакций. Протокол приводится для объема 25 мкл. Для другого объема – пересчитать.

5. Разнесите в чистые реакционные пробирки по 8 мкл общей смеси. Закройте пробирки.

6. Разморозьте образцы НК и прогрейте 1–2 мин при +50 °С. Тщательно перемешайте на вортексе, сбросьте капли в микроцентрифуге.

7. По очереди открывая пробирки, добавьте пробы НК по 17 мкл, перемешайте пипетированием 2-3 раза и закройте пробирки. Меняйте наконечники перед каждым отбором пробы.

Пробы необходимо добавлять в следующем порядке:

- Вода или буфер для элюции ДНК для отрицательного контроля «NTC»;
- Анализируемые образцы НК;
- Положительные контрольные образцы.

8. Сбросьте капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 15 секунд.

9. Без промедления аккуратно перенесите пробирки в блок амплификатора.

## 6.4. Амплификация

Стадия	Температура	Время инкубации	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	37–55 °С	15 мин	1
Активация полимеразы, инаktivация ревертазы	95 °С	1 мин	1
Денатурация	95 °С	10-15 с	
Отжиг	T <sub>m</sub> (50–68 °С)	10-15 с	до 50
Элонгация и измерение флуоресценции	72 °С	5-10 с	
Кривая плавления*	От 55 до 95 °С с шагом 0.5 °С	–	1

\* Только при детекции с помощью интеркалирующего красителя.

## 7. Анализ результатов

### 7.1. Анализ реакции «NTC»

(контроль всех реактивов без внесения образца НК)

**Вариант А.** Если сигнал флуоресценции не развивается или развивается после 38 цикла, это означает, что реагенты не контаминированы посторонней ДНК или РНК – можно переходить к анализу образцов.

**Вариант Б.** Если в образце «NTC» реакция проходит и сигнал развивается до 38 цикла, реагенты или реакционная смесь контаминированы. Необходимо аккуратно переставить реакцию, сменив воду и аликвоты праймеров. В случае повтора – сменить набор реактивов.

Причины контаминации реактивов или помещения:

1. Засор ПЦР-продуктом, полученным ранее при амплификации с этих же праймеров.
2. Засор РНК, геномной ДНК или вирусными частицами при работе с биоматериалом.

При загрязнении рабочих поверхностей, инструментов или дозаторов, их необходимо отмыть или перенести рабочее место в другое помещение.

### 7.2. Анализ исследуемых образцов

Полученный результат можно считать достоверным, если пороговый цикл (Ct) для всех технических повторностей меньше или равен 38-40, а между техническими повторностями разница не более чем 1 цикл.

При анализе экспрессии эукариот проверьте, какой тип мишени определен (см. п. 5.1. «Подбор праймеров» и рис. 1 на стр. 10).

### 7.3. Особенности анализа РНК эукариот

При анализе следует учитывать вариант расположения праймеров относительно интронов (см. рис. 1).

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 процессированную кДНК, а амплификация с генома исключается. Для максимального эффекта рекомендуется использовать оба праймера на стыках экзонов.

При подборе системы рекомендуется использовать вариант 3 – при любом способе детекции. При детекции с помощью интеркалирующего красителя также допустим вариант 2.

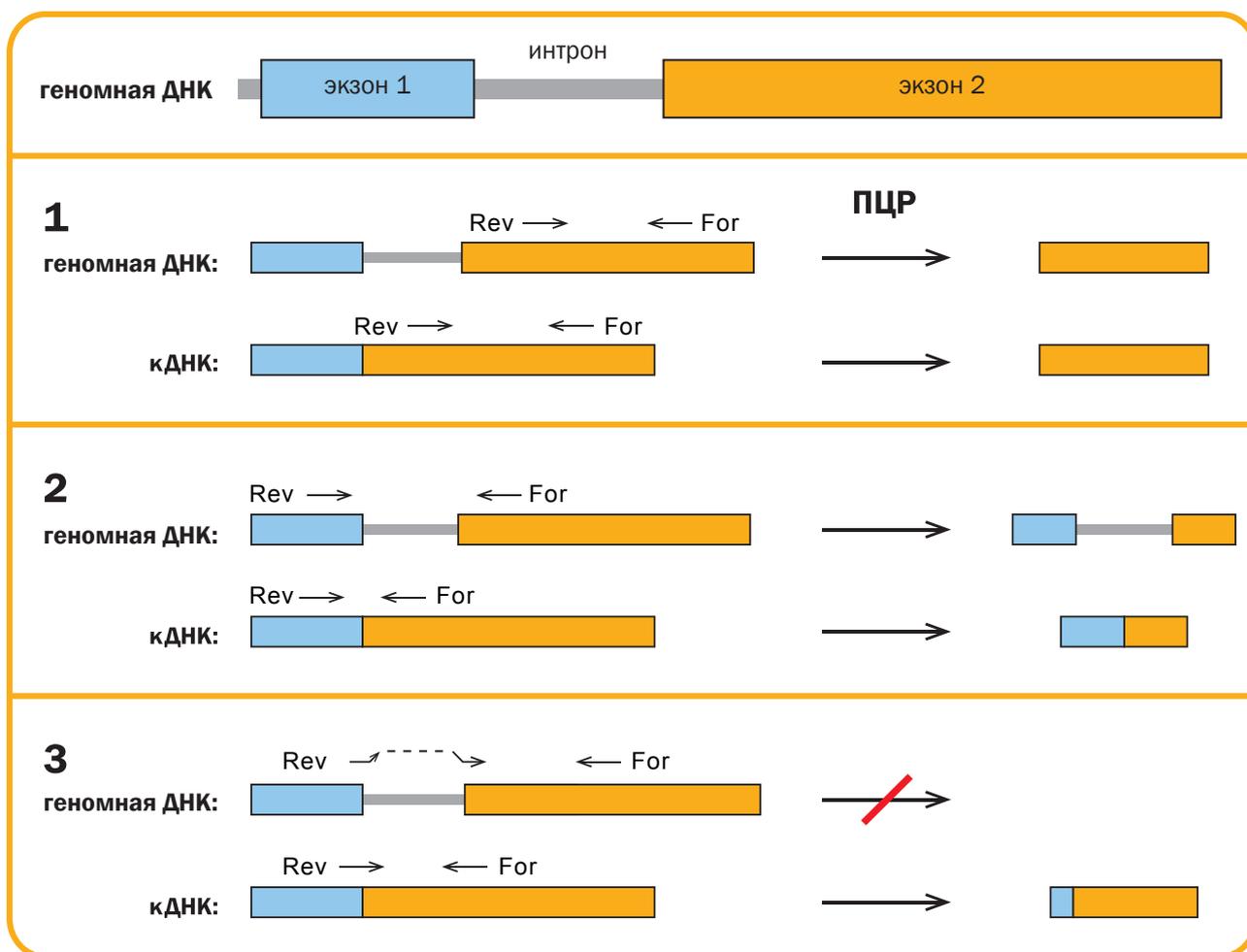


Рис. 1. Варианты расположения праймеров.

# Продукты и услуги компании Евроген

## Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки

нуклеиновых кислот **P**▶▶▶

Маркеры длин ДНК **P**▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**▶▶▶

Приготовление библиотек кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Синтез кДНК и RACE **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Клонирование ДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Нормализация кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Практикум по генной инженерии **P**▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру **S**▶▶▶

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**▶▶▶

Синтез генов **S**▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез **S**▶▶▶

*Техническая поддержка: [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)*

**P**▶▶▶ – ссылка на страницу  
ПРОДУКТА

**S**▶▶▶ – ссылка на страницу  
УСЛУГИ

## Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**▶▶▶

Флуоресцентные белки **P**▶▶▶

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**▶▶▶

Антитела против флуоресцентных белков **P**▶▶▶

Временная трансфекция клеточных линий **S**▶▶▶

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**▶▶▶

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**▶▶▶

*Техническая поддержка: [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)*

## Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии

и генетики наследственных заболеваний **S**▶▶▶

*Техническая поддержка: [oncology@evrogen.ru](mailto:oncology@evrogen.ru)*

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](http://www.evrogen.ru)