

# OneTube RT-PCR SYBR

Набор для одноэтапного анализа транскриптов РНК методом ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I

Номера по каталогу

SK032S — 100 реакций

SK032M — 500 реакций

Инструкция по применению

## Назначение

Набор для одноэтапного анализа транскриптов РНК методом ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I.

OneTube RT-PCR SYBR позволяет быстро и надежно проанализировать большое количество проб РНК, в том числе в высокопроизводительных приложениях. Для амплификации используют праймеры, специфичные к кодирующим участкам генома, и универсальный ОТ-ПЦР протокол.

Формат набора позволяет независимо контролировать пробу РНК на присутствие примеси геномной ДНК с помощью реакции без обратной транскрипции, чтобы исключить ложноположительные результаты.

Компоненты набора	SK032S (100 р-ций)	SK032M (500 р-ций)
5X OneTube PCRmix SYBR	600 мкл	3 мл (5 x 600 мкл)
S-OneTube Reverse Transcriptase	100 мкл	500 мкл
PCR Grade Water	1.5 мл	7.5 мл (5 x 1.5 мл)
25X High ROX	100 мкл	
25X Low ROX	100 мкл	500 мкл по запросу*

\*В состав набора SK032M не входит референсный краситель. Если для используемого амплификатора необходим раствор ROX, с набором можно бесплатно заказать 25X High ROX (кат. # PB223) или 25X Low ROX (кат. # PB224).

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

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

**Таблица 1** – выбор красителя ROX в зависимости от прибора ПЦР-РВ

Приборы для амплификации	Референсный краситель
BIO-RAD: CFX96™, Rotor-Gene Q, LightCycler® 480, DTprime	не используется
Life Technologies (ABI): 5700, PRISM® 7000, 7300, PRISM® 7700, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™	25X High ROX
Life Technologies (ABI): 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 12K, QuantStudio™ 3, QuantStudio™ 5; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	25X Low ROX

### 5X OneTube PCRmix SYBR

- Содержит реакционный буфер для обратной транскрипции и ПЦР, смесь нуклеотидтрифосфатов, ионы Mg<sup>2+</sup> и Taq ДНК-полимеразу с «горячим стартом». На первом этапе, когда происходит синтез первой цепи кДНК, Taq-полимераза инактивирована моноклональными антителами; прогрев при 95 °С обеспечивает быстрый «горячий старт».
- Содержит интеркалирующий краситель SYBR Green I, позволяющий детектировать в режиме реального времени двухцепочечную ДНК, образующуюся в ходе ПЦР.
- Финальная концентрация ионов магния в реакционной смеси — 4 мМ.

### S-OneTube ревертаза

- Ревертаза S-OneTube — модифицированная MMLV-ревертаза. Обладает высокой процессивностью и точностью синтеза кДНК, лишена активности РНКазы Н.
- Сохраняет активность при 55 °С, инактивируется при 95 °С.
- S-OneTube ревертаза добавляется в реакционную смесь отдельно. Это позволяет поставить контроль «No RT» (контроль амплификации непосредственно с остаточной геномной ДНК).

## Основные свойства

- Синтез кДНК и ПЦР выполняются последовательно в одной пробирке.
- Термостабильная ревертаза (55 °С).
- «Горячий старт» амплификации, снижающий вероятность развития неспецифической реакции.
- Детекция в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I.
- Рекомендуемая длина ампликонов — до 300 п.о.
- Амплифицированный ПЦР-фрагмент может быть клонирован без предварительной обработки рестриктазами в рAL2-T или рKAN-T векторы (кат. ## TA002, TA003, Евроген) за счет выступающих «липких» дезоксиаденозиновых остатков.

## Преимущества использования набора

- Сокращение времени подготовки и проведения реакции.
- Снижение вероятности контаминации.
- Простой контроль наличия геномной ДНК в пробах РНК.
- Стандартизация условий постановки однотипных реакций, снижение погрешности при смешивании компонентов реакций в разных экспериментах.
- Постановка может быть выполнена на любых ПЦР-РВ амплификаторах.

В состав набора SK032S входят пробирки с раствором ROX, который требуется для некоторых типов амплификаторов в качестве референсного красителя (см. табл. 1).

Набор SK032M бесплатно комплектуется раствором ROX по запросу пользователя.

## Рекомендации по используемым праймерам и РНК

### Праймеры

- В реакции используется пара ген-специфичных праймеров в конечной концентрации 0.05–0.4 мкМ. Использование случайных или олиго(dT) праймеров не рекомендуется во избежание амплификации неспецифических продуктов.
- Рекомендуется подбирать праймеры таким образом, чтобы между их сайтами отжига был расположен интрон — это снижает риск амплификации геномной ДНК (см. рис. 1 на стр. 7 – вариант 2 и 3).
- При невозможности оптимально подобрать расположение праймеров образцы РНК рекомендуется обработать ДНКазой (в набор не входит).

### РНК

- Рекомендуемое количество РНК в реакции: от 100 пг до 100 нг.
- Для получения воспроизводимых результатов необходимо стандартизировать выделение проб РНК. Важно чтобы в серийных постановках образцы РНК не имели существенного разброса по концентрации, степени деградации и не содержали ингибиторов ПЦР.

## ПРОТОКОЛ

Реакции с исследуемыми образцами РНК необходимо ставить одновременно с двумя контрольными реакциями:

- отрицательный контроль без матрицы («NTC») — реакция для проверки чистоты реактивов от примесей экзогенной ДНК;
- отрицательный контроль без ревертазы («No RT») — контроль загрязнения препарата РНК геномной ДНК.

Желательно включать в эксперимент положительный контроль — образец РНК, на котором ранее были отработаны условия реакции.

### I. Подготовка реагентов

1. Рассчитайте необходимый объем компонентов исходя из числа образцов, включая контрольные. Для каждой используемой пары праймеров необходима минимум одна реакция «NTC». Для каждого исследуемого образца РНК — минимум одна реакция «No RT».

Таблица 2 – количество реагентов на 1 реакцию объемом 25 мкл

Компонент	Реакция «NTC»	Реакция «No RT»	Реакция «Опыт»	Конечная концентрация в 1X смеси
5X OneTube PCRmix SYBR	5 мкл	5 мкл	5 мкл	1X
Праймеры F и R	переменный	переменный	переменный	0.05–0.4 мкМ
25X ROX (опционально, см. табл. 1)	1 мкл	1 мкл	1 мкл	1X
S-OneTube Reverse Transcriptase (25–50X)	0.5–1 мкл	—	0.5–1 мкл	1X
РНК-матрица	—	переменный	переменный	10 пг – 500 нг
PCR Grade Water	довести до 25 мкл	довести до 25 мкл	довести до 25 мкл	—

2. Поместите S-OneTube ревертазу в охлажденный штатив или на лед.
3. Разморозьте остальные компоненты набора при комнатной температуре, 5X OneTube PCRmix SYBR **тщательно перемешайте**, перевернув пробирку, затем импульсно встряхнув на вортексе в течение 1–2 с. Сбросьте капли со стенок пробирок в микроцентрифуге.
4. Разморозьте образцы РНК при комнатной температуре и прогрейте 1–2 мин при +50 °С. Тщательно перемешайте пипетированием, сбросьте капли в микроцентрифуге.

Далее выберите протокол, исходя из количества РНК в реакции.

## II. Приготовление реакции

### А. Стандартный протокол (1 нг РНК в реакции и более)

1. Приготовьте реакционные смеси для исследуемых и контрольных образцов, исходя из расчета в пункте 1 раздела «I. Подготовка реагентов».

**ВНИМАНИЕ!** Ревертазу необходимо добавлять в последнюю очередь.

2. Сбросьте капли со стенок центрифугированием в течение 15 с.

3. Без промедления аккуратно перенесите пробирки в блок амплификатора. Далее перейдите к пункту «III. Амплификация».

### Б. Протокол для низкого количества РНК (1 нг РНК в реакции и менее)

1. Смешайте в пробирках рассчитанное количество:

- реверсного (R, затравочного) праймера и воды (для реакций «NTC»);
- реверсного праймера и РНК для реакций с матрицей («Опыт» и «No RT»).

2. Прогрейте смеси в течение 3 мин при +65 °С, после чего поместите пробирки в лед.

3. Приготовьте конечные реакционные смеси для исследуемых и контрольных образцов, исходя из расчета в пункте 1 раздела «I. Подготовка реагентов».

**ВНИМАНИЕ!** Ревертазу необходимо добавлять в последнюю очередь.

4. Сбросьте капли со стенок центрифугированием в течение 15 с.

5. Без промедления аккуратно перенесите пробирки в блок амплификатора. Далее перейдите к пункту «III. Амплификация».

### III. Амплификация

Стадия	Температура	Время инкубации	Кол-во циклов	Считывание флуоресценции
Обратная транскрипция	50–55 °C	15 мин	1	нет
Активация полимеразы, инаktivация ревертазы	95 °C	1 мин	1	нет
Денатурация	95 °C	15 с		нет
Отжиг*	T <sub>m</sub> (50–68 °C)	20 с	40	нет
Элонгация и измерение флуоресценции	72 °C	1 мин на 1 т.п.о.		да

\* Температура отжига (T<sub>m</sub>) определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета температуры отжига можно воспользоваться формулой:  $T_m (°C) = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$ .

Оптимальная T<sub>m</sub> может отличаться от расчетной. Рекомендуется точно определить ее, используя градиент температур. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов (T<sub>m</sub> +5 °C) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

В случае анализа продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза рекомендуется использовать 1X TAE-буфер с бромистым этидием.

### IV. Анализ отрицательных контролей

При анализе результатов эксперимента следует учитывать, на какую часть гена были написаны праймеры.

Существует несколько вариантов расположения праймеров относительно интронов (см. рис. 1):

1. Оба праймера расположены внутри одного экзона (фрагмент геномной ДНК совпадает по размеру с фрагментом кДНК).
2. Праймеры расположены в разных экзонах (между местами их отжига есть интрон). В этом случае амплифицируемый фрагмент ДНК будет содержать интрон, из-за чего фрагмент геномной ДНК будет больше фрагмента кДНК и её амплификация будет затруднена.
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.

При подборе системы рекомендуется использовать вариант 2 или 3.

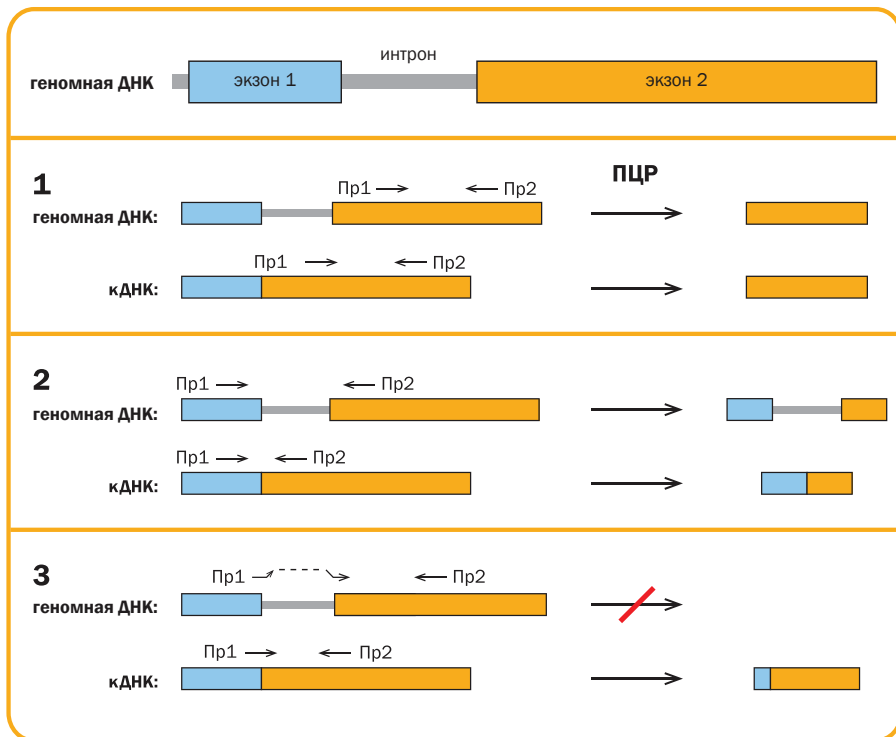


Рисунок 1 – варианты расположения праймеров

**ВНИМАНИЕ!** При разработке протокола анализа следует сначала убедиться, что пара праймеров не образует неспецифических ПЦР-продуктов при амплификации с матрицы кДНК. Для этого необходимо проанализировать ПЦР-продукт с помощью гель-электрофореза и сравнить длину фрагмента с ожидаемой длиной ампликона.

## IV.1. Анализ реакции «NTC» (контроль всех реактивов без внесения РНК)

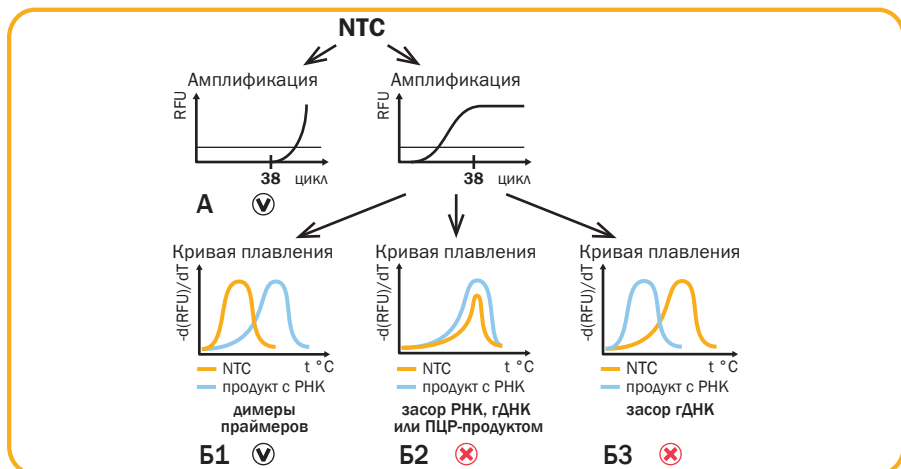


Рисунок 2 – анализ контролей «NTC»

- А.** Если сигнал флуоресценции не развивается или развивается после 38 цикла (**рис. 2, А**), это означает, что реагенты не контаминированы посторонней ДНК, димеры праймеров не образуются — можно переходить к анализу «No RT».
- Б.** Если в образце «NTC» реакция проходит и сигнал развивается до 38 цикла, это может быть вызвано загрязнением реагентов ДНК/РНК или димеризацией праймеров. Отличить контаминацию от димеризации в ряде случаев можно по анализу пика кривой плавления продукта:
- Пик кривой плавления в образце «NTC» левее пика целевого продукта, полученного с РНК (**рис. 2, Б1**). В этом случае, возможно, в реакции образуются димеры праймеров. Это можно проверить, если проанализировать продукты ПЦР электрофорезом в агарозном геле. Обычно димеры праймеров не мешают проведению анализа. Однако, следует учитывать, что продукт димеризации будет присутствовать во всех реакциях с этой парой праймеров и может влиять на количественный анализ экспрессии генов.
  - Пик кривой плавления в образце «NTC» совпадает с целевым продуктом или находится правее (**рис. 2, Б2 и Б3**). В этом случае предполагается, что произошло загрязнение реакционной смеси РНК или посторонней ДНК (продуктами ПЦР или геномной ДНК).

В зависимости от расположения праймеров в гене (**см. рис. 1**), ПЦР-продукты с геномной ДНК могут совпадать по длине с целевым продуктом с РНК (в этом случае температуры плавления обоих пиков совпадают), или быть длиннее (в этом случае пик чаще всего смещается вправо). Работа с контаминированными реактивами должна быть приостановлена (**см. Причины контаминации на стр. 10**).



## IV.2. Анализ реакции «No RT»

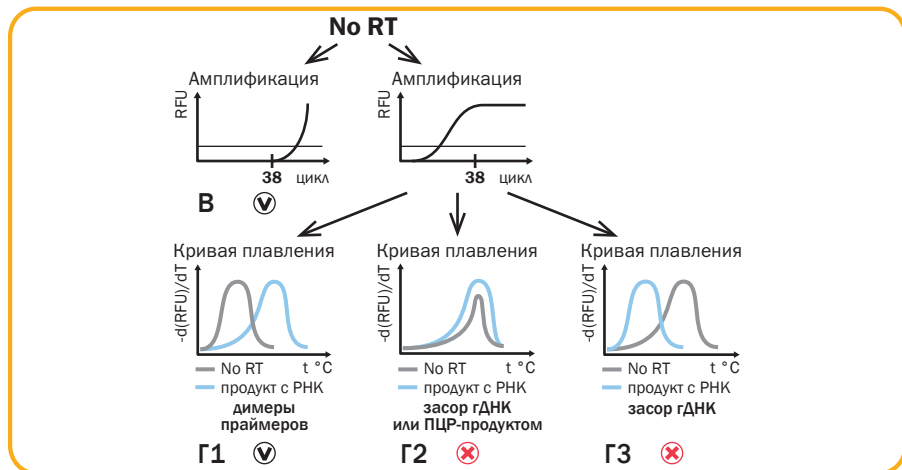


Рисунок 3 – анализ контролей «No RT»

**В.** Если флуоресцентный сигнал не развивается или развивается после 38 цикла (**рис. 3, В**), это означает, что в образце нет геномной ДНК, димеры праймеров не образуются — можно переходить к анализу экспрессии продукта в исследуемых образцах.

**Г.** Если в образце «No RT» наблюдается разгорание флуоресцентного сигнала до 38 цикла, это может быть обусловлено димеризацией праймеров или амплификацией с геномной ДНК, присутствующей в образце РНК. Отличить димеризацию от амплификации с геномной ДНК в ряде случаев можно по анализу пика кривой плавления продукта:

- Пик кривой плавления «No RT» левее пика целевого продукта, полученного с РНК (**рис. 3, Г1**). В этом случае можно предположить наличие в реакции димеров праймеров.
- Пик кривой плавления образца «No RT» совпадает с целевым продуктом или находится правее. В этом случае наиболее вероятно, что в образце РНК присутствует примесь геномной ДНК (**рис. 3, Г1 и Г2**).

В зависимости от расположения праймеров в гене (**см. рис. 1**), ПЦР-продукты с генома могут совпадать по длине с целевым продуктом с РНК (в этом случае температуры плавления обоих пиков совпадают), или быть длиннее (в этом случае пик чаще всего смещается вправо). При обнаружении примесей геномной ДНК в образце РНК рекомендуется провести обработку образцов ДНКазой и повторить эксперимент.

## **Причины контаминации реактивов или реакционной смеси**

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

Если посторонняя ДНК попала в реактивы, их необходимо заменить. При загрязнении рабочих поверхностей, инструментов или дозаторов, их необходимо отмыть или перенести рабочее место в другое помещение.

## **Ограничение к использованию**

Набор предназначен только для научно-исследовательских целей.

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

## Продукты и услуги компании Евроген

**P**>>> – ссылка на страницу  
ПРОДУКТА

### 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*

### 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*

### Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии  
и генетики наследственных заболеваний **S**>>>

*Техническая поддержка: oncology@evrogen.ru*

Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

корпус 15

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru