

Набор Easy RT-PCR

Для исследовательских работ *in vitro*

Набор реактивов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации к ДНК

Кат.№	Количество
RTPK-50	50 реакций
RTPK-100	100 реакций

Набор Easy RT-PCR состоит из высококачественных реактивов для обратной транскрипции РНК, выделенной из различных источников с последующей амплификацией полученной кДНК

Качество **МастерМикса** гарантируется на протяжении более 1 года, при -20°C.

Описание:

Набор Easy RT-PCR рекомендуется для проведения обратной транскрипции РНК, выделенной из различных источников с последующей амплификацией полученной кДНК.

5X Набор Easy RT-PCR:
5X RTМастерМикс
MMuLVH- обратная транскриптаза
RNAsine ингибитор рибонуклеаз
 dA,dT,dC,dG -500µM каждого
 Реакционный буфер
 MgCl₂ – 3.0mM
(1X конечная концентрация)
 Стабилизатор/энхансер

5X Mas^{CFE}Mix-2025
SmarTaq полимеразы
 dA,dT,dC,dG -200µM каждого
 Реакционный буфер
 MgCl₂ – 2.0mM
(1X конечная концентрация)
 Стабилизатор/энхансер

В Набор Easy RT-PCR входит

-**5X RTМастерМикс**, содержащий **MMuLVH- обратную транскриптазу** выделенную из рекомбинантного штамма *E.coli*, несущего ген обратной транскриптазы **Moloney Murine Leukemia Virus (Фермент не содержит нативной РНК-азной активности)** и **RNAsine** нативный белок, обладающий высокой специфической активностью ингибирования различных типов рибонуклеаз (РНКазы А,В,С), дезоксинуклеотидтрифосфаты, компоненты реакционного буфера и оптимальная концентрация MgCl₂.

-**5X Mas^{CFE}Mix-2025** - МастерМикс для проведения амплификации кДНК, полученной в процессе ревертирования РНК. **5X Mas^{CFE}Mix-2025** содержит «хот-старт» **SmarTaq** полимеразу, компоненты буфера, оптимизированного для проведения амплификации, дезоксинуклеотид трифосфаты, оптимальную концентрацию MgCl₂, стабилизатор/энхансер.

Набор Easy RT-PCR содержит оптимальные концентрации всех реагентов для эффективного проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК в «классической» ПЦР и ПРЦ в «реальном времени».

Набор Easy RT-PCR позволяет проводить обратную транскрипцию при повышенных температурах (вплоть до +65°C), что дает возможность использовать **Набор Easy RT-PCR** сложных участков РНК.

Наличие в **Мастер Миксах** стабилизатора увеличивает стабильность продукта при транспортировке и использовании для проведения обратной транскрипции РНК.

Общий протокол Обратной Транскрипции

Набор Easy RT-PCR применяется для обратной транскрипции РНК, выделенной из различных источников и амплификации кДНК, полученной после ревертирования. Чувствительность определения находится в пределах от 1 пикога до 20 нг для поли(А) РНК (мРНК) и /или 10 пг до 1 мкг тотальной РНК.

Обратная транскрипция без денатурации образца РНК:

Добавьте следующие компоненты в чистую пробирку для амплификации. Все манипуляции необходимо проводить на льду, тщательно перемешивая добавляемые компоненты.

Реактив	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Объем реакции, 25 мкл
5X RT MasMix-30100	5X	1X	5 мкл
Праймеры (oligo dT ₁₀₋₂₅ или "random" праймер)	50 мкМ	0,4-1 мкМ	0,2-0,5 мкл
Образец РНК	Опционно*	1 пг-1 мкг для тотальной РНК 10 пг-500 нг мРНК	-
Вода для ПЦР	-	-	До 25 мкл

*- Определяется пользователем

Поведите Обратную Транскрипцию как предложено ниже:

Поместите пробирку(ки) в амплификатор и проведите обратную Транскрипцию и амплификацию по следующей схеме:

Обратная транскрипция	25°C	10 мин	1X цикл
	42-50°C	30 мин	1X цикл
Инактивирование ревертазы	85°C	5 мин	1X цикл
Хранение	4°C		

Для последующего анализа рекомендуется брать не более 2 мкл, полученного раствора кДНК на реакцию амплификации объемом 25 мкл.

После проведения обратной транскрипции образца РНК проведите амплификацию, полученной кДНК.

Ниже представлен общий протокол амплификации

Общий протокол Амплификации

Смешайте в пробирке следующие компоненты.

Реактив	Исходная концентрация	Конечная концентрация	Объем реакции, 25 мкл
5X Mas ^{CFE} Mix-2025	5X	1X	5 мкл
Специфические Праймеры	5-7,5 пмоль/мкл	-	1 мкл каждого
Образец кДНК	Опционно	-	1-2 мкл
Вода для ПЦР	-	-	До 25 мкл

Тщательно перемешайте. Если на стенках пробирки есть капли раствора, осадите их в раствор кратковременным центрифугированием.

Поместите пробирку (пробирки) в амплификатор и проведите амплификацию в заданном режиме.

Для достижения оптимального результата для каждой новой пары специфических праймеров необходима оптимизация температурного режима амплификации.

Ниже приведен общий протокол амплификации:

Условия Амплификации

	3-х стадийный ПЦР		Кол-во
	T°C	время	циклов
Начальная ¹⁾ денатурация	94-95°C	2-5 мин	1
Денатурация	94-95°C	5-10 сек	30-40
Отжиг	50-62 ²⁾	10-30 сек	
Элонгация	72°C	30сек -1мин/Кб	
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	1
	4°C	hold	

Для достижения оптимального результата для каждой новой пары специфических праймеров необходима оптимизация температурного режима амплификации.

Для проведения оптимизации режима амплификации рекомендуется проведение амплификации в градиенте, для определения оптимальных параметров отжига подобранных праймеров.