

ArtMix-RT ревертаза

Методические указания по применению

Каталожный №	Комплектация
<input type="checkbox"/> 256432	– 5-кратная смесь реагентов ArtMix-RT, 0,5 мл

1. Описание

ArtMix-RT ревертаза представляет собой универсальный готовый к использованию реагент для получения кДНК с последующей ПЦР с детекцией результатов в реальном времени. При этом синтез кДНК и ПЦР осуществляется в одной пробирке. ArtMix-RT ревертаза содержит все основные реагенты, включая ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ и оптимизированный буфер.

Использование ArtMix-RT ревертазы для проведения ОТ-ПЦР обеспечивает получение воспроизводимых результатов с высокой чувствительностью (единичные копии РНК).

В состав ArtMix-RT ревертазы входит генетически модифицированная ревертаза MMLV с подавленной активностью РНКазы Н и повышенной термостабильностью, а также улучшенной эффективностью при использовании GC-богатых РНК-матриц, что приводит к увеличению выхода кДНК.

Кроме того, в состав ArtMix-RT ревертазы входит инактивированная антигенами ДНК-полимеразы, которая не обладает ферментативной активностью в условиях приготовления реакционной смеси и ревертирования, что приводит к повышению специфичности и чувствительности реакции. Активация фермента происходит автоматически в процессе первого цикла денатурации ДНК при температуре выше 55 °С.

Премикс обеспечивает проведение мультиплексных ПЦР-РВ (до 4 одновременно-детектируемых мишеней). При постановке мультиплексных реакций рекомендуется оптимизация количества олигонуклеотидов и

зонда (при его использовании) для каждой мишени, а также время ревертирования.

2. Область применения

- Мультиплекс ОТ-ПЦР;
- Рутинная ОТ-ПЦР;
- Низкокопийная ОТ-ПЦР;
- Высокоспецифичная ОТ-ПЦР;
- ОТ-ПЦР с двумеченными зондами

3. Стандартный протокол ОТ-ПЦР с использованием ArtMix-RT ревертазы

Для уменьшения ошибки пипетирования при постановке нескольких параллельных реакций рекомендуется приготовить общий ПЦР-премикс, содержащий все компоненты смеси (воду, ArtMix-RT, праймеры) за исключением РНК-матрицы. Объем ПЦР-премикса рассчитывается исходя из числа реакций с добавлением одного дополнительного образца. После того, как аликваты ПЦР-премикса будут внесены в предварительно промаркированные ПЦР-пробирки, в них добавляют соответствующую РНК-матрицу.

1. Перед использованием разморозить и аккуратно (путем переворачивания) перемешать все компоненты реакционной смеси.

2. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 1. Количество вносимых компонентов приведено для одной реакции объемом 25 мкл.

Таблица 1. Состав реакционной смеси для постановки ОТ-ПЦР

Компонент	Объем	Конечная конц.
ArtMix-RT (5х смесь)	5 мкл	1-кратный
Прямой праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
Обратный праймер (50 мкМ)	0,2 мкл	0,4 мкМ
РНК-матрица	Определяется пользователем	0,04 пг/мкл – 200 нг/мкл
Вода (свободная от РНКаз)	Довести объем реакционной смеси до 25 мкл	

В зависимости от особенностей используемой матрицы и задач исследования, состав реакционной смеси может быть оптимизирован.

- оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне от 0,05 до 1 мкМ;
 - на одну реакцию объемом 25 мкл рекомендуется использовать 1 пг – 5 мкг тотальной РНК или 10 пг – 500 нг мРНК.

Рекомендуется дополнительно включать в анализ NTC (no template control) – реакцию, содержащую все компоненты реакции кроме РНК-матрицы.

Допустимо приготовление реакционной смеси при комнатной температуре.

Допускается использование праймеров и зондов с другой начальной концентрацией.

Для предотвращения возможной деградации проб рекомендовано использовать стерильную воду, свободную от РНКаз (например, обработанную диэтилпирикарбонатом (DEPC)).

Рекомендуемый объем ПЦР-смеси для одной реакции – 25 мкл. Однако при необходимости объем реакционной смеси может быть изменен с сохранением конечной концентрации входящих в нее компонентов.

3. Аккуратно перемешать реакционную смесь и осадить капли со стенок пробирки.

4. Провести ОТ-ПЦР согласно таблице 2.

Таблица 2. Температурный профиль ПЦР

Этап	Температура	Время	Кол-во циклов
Ревертирование	55 °С	10 мин	1
Начальная денатурация	95 °С	2 мин	1
Денатурация	95 °С	10 с	45–50
Отжиг праймеров	60 °С	30 с	

4. Условия хранения и транспортировки

Транспортирование ArtMix-RT ревертазы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37 °С (до 5 суток), при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

ArtMix-RT ревертаза хранится при температуре от -16 °С до -24 °С.

Допускается заморозка/оттаивание не более 10 раз.

Срок годности – 1 год.