



# Инструкция по применению

## 5X Genta Single-tube RT-PCR мастер-микс

Готовая смесь для проведения реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в формате «одной пробирки»

Версия 1 от 12.12.2022

### 1. ОПИСАНИЕ

5X Genta Single-tube RT-PCR мастер-микс – готовая к использованию смесь для проведения реакции синтеза кДНК с последующей количественной и/или качественной ПЦР с возможностью детекции результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

5X Genta Single-tube RT-PCR мастер-микс содержит все необходимые для проведения ОТ-ПЦР компоненты, включая обратную транскриптазу Genta RevM, ДНК-полимеразу Genta TaqF, дНТФ, Mg<sup>2+</sup> и реакционный буфер. Для постановки реакции ОТ-ПЦР в реакционную смесь необходимо добавить только олигонуклеотиды, матрицу и воду.

Genta Rev M представляет собой *in silico* модифицированный гомолог обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV). Genta RevM обратная транскриптаза обладает повышенной термической стабильностью (оптимальная температура для работы фермента – 50°C, фермент сохраняет активность при температуре до 65°C).

Химически инактивированная ДНК-полимераза Genta TaqF позволяет проводить подготовительные работы при комнатной температуре и обеспечивает высокоспецифичную амплификацию благодаря возможности проведения «горячего» старта. Ингибирование активности фермента снимается при его прогревании при 95°C в течение 15 минут.

### 2. СОСТАВ

Компоненты	RT-M-003-S	RT-M-003-L	RT-M-003-X (под заказ)
5X Genta Single-tube RT-PCR мастер-микс	1 x 1,25 мл (250 реакций)	4 x 1,25 мл (1000 реакций)	10 мл и более

### 3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Одностадийная ОТ-ПЦР
- Одностадийная ОТ-ПЦР-РВ с флуоресцентными зондами

#### 4. СОСТАВ ПРЕПАРАТА (1X)

60 мМ Трис-НСl (рН 8.3 при 25°С); 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4 мМ MgSO<sub>4</sub>; 0,01% твин-20; 0,1 мг/мл БСА; 8% глицерин; 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата; Genta Rev M ревертаза; Genta TaqF ДНК-полимераза.

#### 5. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Приготовление реакционной смеси можно проводить на рабочем столе. Последовательность добавления компонентов не имеет значения.
2. Для минимизирования возможной ошибки пипетирования рекомендуется приготовить реакционную смесь, содержащую все компоненты, кроме РНК-матрицы, в расчете на нужное количество реакций плюс одна. Внести в пробирки аликвоты реакционной смеси и затем добавить требуемое количество РНК-матрицы.
3. Состав реакционной смеси:

Компонент	На 25 мкл реакции	На 50 мкл реакции	Конечная концентрация
5X Genta Single-tube RT-PCR	5 мкл	10 мкл	1-кратный (4 мМ MgSO <sub>4</sub> )
Прямой праймер, 10 мкМ	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
Обратный праймер, 10 мкМ	0,5 мкл	1 мкл	0,2 мкМ
Флуоресцентный зонд, 10мкМ (для ПЦР-РВ)	0,25 мкл	0,5 мкл	0,1 мкМ
РНК-матрица	X мкл	X мкл	10 пг – 1 мкг
Вода для ПЦР	До 25 мкл	До 50 мкл	

4. Если в амплификаторе отсутствует нагревающаяся крышка, то в каждую пробирку необходимо добавить каплю минерального масла.
5. Условия термоциклирования:

Шаг	Протокол 1 (с отжигом праймеров)		Протокол 2 (без отжига праймеров)		Количество циклов
	Температура	Время	Температура	Время	
Обратная транскрипция	45 - 55°С	15 - 30 мин	45 - 55°С	15 - 30 мин	1
Предварительная денатурация // активация Genta TaqF	95°С	15 мин	95°С	15 мин	1
Денатурация	95°С	15 - 30 сек	95°С	15 - 30 сек	25 - 45
Отжиг	50-68°С*	10 – 30 с	--	--	



Элонгация	72°C	60 сек / 1 т.п.н.	72°C	60 с / 1 т.п.н.	
Элонгация финальная	72°C	5 – 10 МИН	72°C	5 – 10 МИН	1

\* температура отжига зависит от структуры праймеров

- При температуре плавления праймеров ниже 68°C рекомендуется проводить амплификацию по Протоколу 1. Если температура отжига праймеров выше 68°C, то предпочтительнее использовать для амплификации Протокол 2.

## 6. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ

### ▪ РНК-матрица

Оптимальное количество РНК-матрицы на реакцию 10 пг – 1 мкг.

### ▪ Праймеры

Праймеры для ПЦР обычно имеют длину 15-30 нуклеотидов. Оптимальное содержание GC в праймере - 40-60 %. Компьютерные программы могут быть использованы для дизайна и анализа праймеров. Разницы температур плавления между двумя праймерами не должна превышать 5°C. Финальная концентрация каждого праймера в реакционной смеси может составлять 0,1 – 1 мкМ.

## 7. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. УСЛОВИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ

### • Обратная транскрипция

Обратная транскриптаза Genta RevM обладает повышенной термической стабильностью, оптимальная температура для работы фермента – 50-55°C, фермент сохраняет активность при температуре до 65°C.

### • Денатурация

Genta TaqF полимеразы, входящая в состав мастер-микса, инактивирована с помощью химической модификации, ингибирование активности фермента снимается при его прогревании при 95°C в течение 15 минут. В это же время происходит инактивация обратной транскриптазы Genta Rev M. Во время термоциклирования рекомендована денатурация при 95°C в течение 15-30 сек.

### • Отжиг

Этап отжига обычно составляет 10–30 секунд. Температура отжига зависит от Tпл (температуры плавления) пары праймеров и обычно составляет 45–68°C. Температуру отжига можно оптимизировать, выполнив ПЦР с температурным градиентом, начиная на 5°C ниже расчетной Tпл.



- **Элонгация**

Рекомендуемая температура элонгации – 72°C. Время элонгации для большинства ДНК-матриц составляет 60 сек на каждую тыс. п.н. Время элонгации может быть сокращено до 30-45 сек / 1 т.п.н для плазмид. Для «сложных» или протяженных матриц может потребоваться увеличить время элонгации до 90 с / 1 т.п.н. Рекомендована финальная элонгация при 72°C в течение 5-10 мин.

## **8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ**

Температура хранения: - 20°C.

Условия транспортировки: в термоконтейнере с хладоэлементами, при температуре от 2°C до 8°C не более 7 суток.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки: 24 месяца с момента производства.



## СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

### ✓ **Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность**

Инкубация 10 ед. Genta TaqF ДНК-полимеразы и 200 ед. Genta Rev M обратной транскриптазы с 1 мкг лямбда ДНК/Hind III при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимой деградации фрагментов ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

### ✓ **Неспецифическая эндонуклеазная активность**

Инкубация 25 ед. Genta TaqF ДНК-полимеразы и 300 ед. Genta Rev M обратной транскриптазы с 1 мкг ДНК pUC19 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

### ✓ **РНКазная активность**

Инкубация 10 ед. Genta TaqF ДНК-полимеразы и 200 ед. Genta Rev M обратной транскриптазы с флуоресцентным РНК-субстратом при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

### ✓ **Чистота белка (SDS-ПААГ)**

Genta TaqF и Genta Rev M имеют чистоту  $\geq 99\%$ , определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

### ✓ **Контаминация геномной ДНК *E.coli* (ПЦР-РВ)**

Минимум 10 единиц Genta TaqF ДНК-полимеразы и 300 единиц Genta Rev M обратной транскриптазы были проверены на наличие геномной ДНК *E.coli* с использованием SYBR Green ПЦР-РВ с праймерами, специфичными для локуса 16S рРНК *E.coli*. Контаминация не выявлена.

### ✓ **Функциональное тестирование**

Аmplификация фрагментов разной длины (200 – 5 000 п.н.) и разного GC состава (до 78% GC) с последующей детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (с зондами/интеркалирующим красителем) и методом агарозного гель-электрофореза.

### ***Уважаемый Пользователь!***

*Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!*

*Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем Вам признательны если вы предоставите на обратную связь по адресу [info@genterra.ru](mailto:info@genterra.ru)*

