

MINT-Universal

Набор реактивов для синтеза кДНК

Номер по каталогу SK002

Инструкция по применению

Набор реактивов Mint-Universal предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

Оглавление

I. Назначение	1
II. Метод	1
III. Состав и условия хранения	4
IV. Важные рекомендации и замечания	6
V. Требования к РНК	7
VI. Протокол-1: синтез кДНК для ненаправленного клонирования	9
VII. Протокол-2: синтез кДНК для направленного клонирования	19
VIII. Решение проблем	29
IX. Приложение А Рекомендации по проведению неденатурирующего гель-электрофореза РНК	32
X. Ссылки	33

I. Назначение

Набор реактивов “Mint-Universal” позволяет осуществлять синтез обогащенной полноразмерными последовательностями двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) на матрице полиА⁺ или тотальной РНК. Набор рассчитан на 20 реакций синтеза кДНК.

Полученная дц-кДНК может быть использована для приготовления библиотек кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями, псевдо-Нозерн блота (Franz *et al.*, 1999), супрессионной вычитающей гибридизации кДНК (SSH, Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999) и нормализации кДНК (Zhulidov *et al.*, 2004; Zhulidov *et al.*, 2005) с помощью наборов реактивов “Trimmer” или “Trimmer-Direct” (Евроген кат. NK001, NK002).

Ограничения к применению:

Набор реактивов “Mint-Universal” предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.

II. Метод

В основе метода синтеза дц-кДНК лежит свойство MMLV ревертазы добавлять нематрично на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков, преимущественно dC (Schmidt & Mueller, 1999). Схема метода приведена на **рис. 1**.

Первую цепь кДНК синтезируют на РНК матрице с использованием 3'-праймера (CDS), содержащего олиго(dT) последовательность. Образующаяся первая цепь содержит последовательность 3'-праймера на 5' конце и олиго(dC) последовательность на 3' конце. Эта олиго(dC) последовательность служит местом отжига 30-мерного олигонуклеотидного адаптера (PlugOligo) имеющего комплементарную олиго(dG) последовательность на 3'-конце.

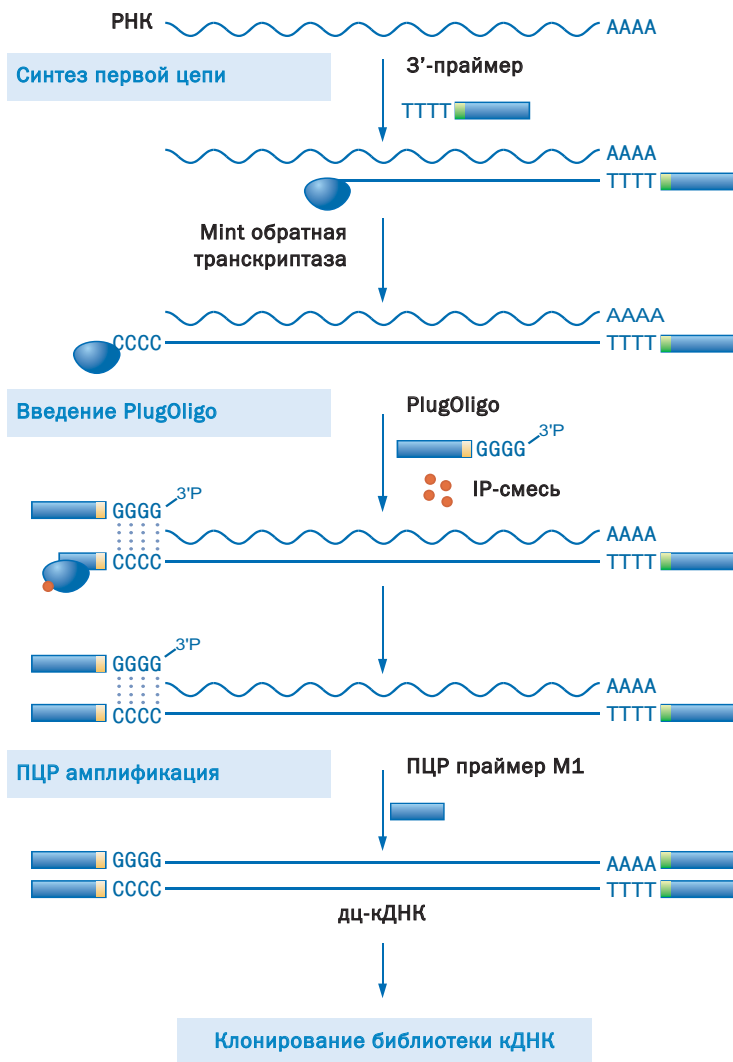


Рис. 1. Схема синтеза кДНК

В определенных условиях, создаваемых за счет добавления IP-смеси, ревертаза воспринимает PlugOligo как продолжение РНК-матрицы и продолжает синтез первой цепи. Таким образом, первая цепь кДНК оказывается фланкирована с одной стороны последовательностью CDS праймера, а с другой – последовательностью, комплементарной PlugOligo.

Первую цепь кДНК амплифицируют в ПЦР с праймером М1, соответствующим внешней части PlugOligo и CDS праймера. Использование Encyclo смеси для ПЦР (Евроген кат. РК001) позволяет получать дц-кДНК, обогащенную полноразмерными последовательностями. За счет использования PlugOligo с заблокированным 3'-концом достигается существенное снижение (по сравнению с аналогами) нежелательной фоновой амплификации.

В состав набора “Mint-Universal” входят две пары адаптеров. Первая (CDS-1 и PlugOligo-1) идентична паре адаптеров, входящей в набор “Mint” (кат. SK001). Эти адаптеры позволяют осуществлять синтез кДНК, фланкированной одинаковыми последовательностями (см. **Протокол-1** для синтеза кДНК). Полученная кДНК может быть использована для ненаправленного клонирования библиотек, псевдо-Нозерн блота (Franz *et al.*, 1999), супрессионной вычитающей гибридизации кДНК (SSH, Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999) и нормализации кДНК (Zhulidov *et al.*, 2004; Zhulidov *et al.*, 2005) с помощью набора реактивов “Trimmer” (Евроген кат. NK001).

Вторая пара содержит адаптеры CDS-3М и PlugOligo-3М, имеющие асимметричные сайты для эндонуклеазы рестрикции SfiI (**рис. 2**). Эти сайты могут быть использованы для направленного клонирования кДНК, приготовленной с использованием **Протокола-2** для синтеза кДНК. После обработки эндонуклеазой рестрикции SfiI, кДНК может быть клонирована в соответствующий SfiI-обработанный вектор или нормализована с помощью набора реактивов “Trimmer-Direct” (Евроген кат. NK002).

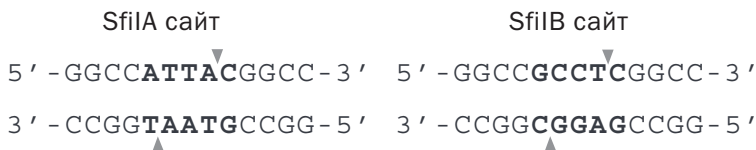


Рис.2. Сайты рестрикции эндонуклеазы SfiI (A & B).

Примечание. Перед направленным клонированием библиотек кДНК, мы рекомендуем осуществлять удаление нежелательной низкомолекулярной фракции с помощью гель-фильтрации на колонках ChromaSpin-400 или ChromaSpin-1000 (Clontech) или аналогичных.

III. Состав и условия хранения

A. Список компонентов (на 20 реакций)

Коробка 1

Компонент *	Количество
5X First-Strand Buffer	80 мкл
DTT (20mM)	30 мкл
10X dNTP mix (10mM each)	25 мкл
PlugOligo-1 adapter (15 µM)* 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT <u>AC</u> GGGGG-P-3'	25 мкл
CDS-1 adapter (10 µM)* 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT <u>AC</u> (T) ₃₀ VN -3'	25 мкл
PlugOligo-3M adapter (15 µM)* 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCC <u>ATTAC</u> GCCGGGGG-P-3'	25 мкл
CDS-3M adapter (10 µM)* 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCC <u>GAGGCC</u> GCC(T) ₂₀ VN -3'	25 мкл
Mint Reverse Transcriptase	20 мкл
IP-solution	130 мкл
Control total RNA template (0.5 µg/µl)	15 мкл
Sterile RNase free water	1.8 мл

Коробка 2

Компонент *	Количество
50X Encyclo polymerase mix	50 мкл
10X Encyclo buffer	300 мкл
PCR Primer M1 (10 µM) 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	100 мкл
50X dNTP mix (10mM each)	80 мкл
Sterile RNase free water	1.8 мл
Control amplified cDNA sample 1 (for electrophoresis)	25 мкл
Control amplified cDNA sample 2 (for electrophoresis)	25 мкл

* Пробирки, содержащие указанные компоненты, подписаны по-английски, английские названия даны в скобках.

** Сайты рестрикции RsaI и SfiI подчеркнуты; N = A, C, G или T; V = A, G или C.

Все компоненты хранить при -20°C

Б. Необходимые реагенты, не входящие в состав набора:

- минеральное масло;
- ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) /необязательно/;
- реагенты для гель-электрофореза на агарозе;
- маркер молекулярных весов ДНК;
- колонки для фракционирования ДНК по длине (Clontech ChromaSpin-400, ChromaSpin-1000 или аналогичный).

IV. Важные рекомендации и замечания

Пожалуйста, ознакомьтесь перед началом работы

A. Как избежать контаминации и деградации РНК и ДНК

Даже небольшие количества посторонней ДНК или РНК-матрицы могут привести к образованию неспецифического продукта в ходе синтеза кДНК. Мы рекомендуем:

- смешивать реагенты для синтеза кДНК в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и РНК и анализа продуктов ПЦР;
- использовать для работы наконечники для автоматических пипеток, имеющие аэрозольный фильтр;
- для контроля за уровнем возможной контаминации включать отрицательный контроль (в реакцию вместо ДНК или РНК-матрицы добавлять стерильную воду) в каждый эксперимент;
- использовать стерильные одноразовые перчатки.

B. Положительный контроль

Положительный контроль необходим для проверки работы всех компонентов реакции. В состав набора входит контрольная тотальная РНК, которую следует использовать в контрольном эксперименте.

V. Приготовление реакционных смесей

При одновременном проведении нескольких реакций рекомендуется приготовление общих реакционных смесей (master mix), содержащих общие для всех реакций компоненты. Те компоненты, которые варьируют от реакции к реакции, добавляют после разнесения аликвот реакционной смеси по пробиркам для проведения реакции.

Использование общей реакционной смеси позволяет исключить разброс в количестве компонентов реакции от пробирки к пробирке.

После приготовления реакционной смеси её необходимо перемешать, сбросить оставшиеся на стенках пробирки капли с помощью быстрого центрифугирования и быстро разнести аликвоты по пробиркам.

При смешивании малых объемов реагентов (например, при добавлении матрицы в реакционную смесь) обратите внимание, чтобы на внешней стороне носика не оставалось дополнительных капель.

Ферменты следует добавлять в последнюю очередь и перемешивать аккуратным пипетированием, избегая вспенивания реакционной смеси.

V. Требования к РНК

Пожалуйста, ознакомьтесь перед началом работы

1. Минимальное стартовое количество РНК для синтеза первой цепи кДНК составляет 250 нг тотальной или 100 нг полиА⁺ РНК. Для достижения наилучшего результата мы рекомендуем использовать 1-1.5 мкг тотальной РНК или 0.5 - 1 мкг полиА⁺ РНК.

Эффективность синтеза кДНК с помощью набора реактивов Mint-Universal определяется качеством РНК.

2. Для выделения РНК могут быть использованы различные протоколы, например Trizol метод (GIBCO/Life Technologies), метод Chomczynski & Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987), или наборы RNeasy kits (QIAGEN).

3. После выделения РНК мы рекомендуем провести оценку ее качества с помощью гель-электрофореза в агарозе. Можно использовать денатурирующий формальдегидный электрофорез (Sambrook *et al.*, 1989), однако для экспресс-анализа проще выполнить неденатурирующий электрофорез с окрашиванием бромистым этидием (EtBr) как описано в **Приложении А**.

В неденатурирующем агарозном электрофорезе РНК, пригодная для синтеза кДНК, имеет следующие характеристики:

- тотальная РНК из тканей млекопитающих выглядит как шмер, содержащий две интенсивные полосы 28S и 18S рибосомальной РНК. Электрофоретическая подвижность этих полос приблизительно соответствует фрагментам ДНК длиной 4.5 и 1.9 т.п.н. Соотношение интенсивностей полос 28S к 18S РНК не менее 1:1. Изменение соотношения в пользу 18S РНК свидетельствует о частичной деградации образца;
- полиА⁺ РНК млекопитающих выглядит как шмер от 0.1 to 4-7 kb, содержащий слабовыраженные 28S и 18S полосы;
- РНК из других организмов может иметь иные характеристики, например содержать только одну полосу рибосомальной РНК на уровне 18S (Ishikawa, 1977) или иметь шмер длиной до 2-3 т.п.н.

Примечание. Если РНК имеет длину меньше ожидаемой или выглядит деградированной по данным электрофореза, необходимо проверить чистоту и качество реагентов для выделения РНК и повторить выделение.

Примечание. Частично деградированная РНК (образцы тканей, подвергнутые жестким воздействиям, или из больных пациентов) иногда используется для синтеза кДНК – в частности, когда нет возможности повторно провести выделение РНК. Однако, следует иметь в виду, что количество полноразмерных последовательностей в таком образце снижено. Особенно это относится к длинным транскриптам.

4. Наличие геномной ДНК в образцах РНК, как правило, не оказывает заметного влияния на качество синтезируемой кДНК. Использование ДНКаз для удаления геномной ДНК не рекомендуется. В случае необходимости, избыток геномной ДНК может быть удален переосаждением образцов РНК хлоридом лития, фенол-хлороформной экстракцией или дополнительной очисткой на колонке для выделения РНК.

VI. Протокол-1: синтез кДНК для ненаправленного клонирования

A. Синтез первой цепи и введение PlugOligo-1

Для инкубации реакционной смеси используйте ПЦР-амплификатор. Использование воздушного термостата требует дополнительной оптимизации протокола.

Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!

1. Для каждого образца РНК приготовьте первую часть реакционной смеси (в пробирке на 0.2 мл или 0.5 мл), добавляя реагенты в указанном порядке:

x мкл	Стерильная вода
1-3 мкл	Раствор РНК (0.25 - 2 мкг РНК)* Для положительного контроля используйте 2 мкл контрольной тотальной РНК, входящей в состав набора Mint-Universal
1 мкл	CDS-1 праймер (10 мкМ)
1 мкл	PlugOligo-1 адаптор
5 мкл	Суммарный объем первой части реакционной смеси

* Для предотвращения агрегации РНК, перед взятием аликвот прогрейте образцы РНК при 65°C в течение 1-2 мин, перемешайте содержимое и сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Если ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку для предотвращения испарения реакционной смеси.

4. Закройте пробирки и поместите их в амплификатор.

5. Для денатурации РНК запустите инкубацию пробирок при 70°C в течение 2 мин (используйте нагревающуюся крышку, если это возможно). По истечении времени прогрева снизьте температуру инкубации до 42°C, не вынимая пробирки из амплификатора. Убедитесь, что температура пробирок снизилась до 42°C, после чего добавьте вторую часть реакционной смеси.

Примечание. Пока пробирки нагреваются, выполните стадию 6.

Продолжайте инкубацию при 42°C не менее 1-3 мин до добавления второй части реакционной смеси (см. **стадию 6**).

6. Во время инкубации, описанной на стадии 5, приготовьте вторую часть реакционной смеси, смешивая реагенты в указанном порядке:

Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

2 мкл	5X Буфер для синтеза первой цепи
1 мкл	DTT (20 mM)
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
1 мкл	Mint ревертаза
5 мкл	Суммарный объем второй части реакционной смеси

Примечание. При необходимости, во вторую часть реакционной смеси может быть добавлен ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) из расчета 0.5 мкл на реакцию.

7. Аккуратно перемешайте компоненты пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

8. Быстро добавьте по 5 мкл полученной смеси в каждую пробирку с реакционной смесью **со стадии 5**. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

9. Инкубируйте пробирки при 42°C в течение 30 мин, после чего добавьте в каждую пробирку по 5 мкл IP-смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Продолжайте инкубацию при 42°C в течение 1 ч 30 мин.

Примечание. Не держите пробирки с реакционной смесью на комнатной температуре дольше, чем это необходимо, чтобы добавить IP-смесь.

10. После завершения инкубации поместите пробирки в лед для остановки реакции.

Примечание. В ходе реакции на дне пробирок может сформироваться бурый осадок. Он не мешает синтезу и хранению кДНК.

Полученная первая цепь кДНК может быть использована немедленно для приготовления дц-кДНК (раздел VI.Б) или храниться при -20°C в течение 3 месяцев.

Б. Амплификация дц-кДНК

Важные замечания:

1. Использование оптимального количества циклов в ПЦР при амплификации кДНК очень важно для большинства приложений. Избыточное количество циклов ПЦР приводит к накоплению неспецифического продукта ПЦР и может существенно исказить результаты экспериментов. При недостаточном количестве циклов ПЦР получается небольшое количество амплифицированной кДНК. Оптимальное число циклов ПЦР определяется пользователем и зависит от природы экспериментальных образцов. Мы включили в протокол стадию аналитической амплификации в небольшом объеме реакционной смеси, которая нужна для оптимизации числа циклов в случае каждого конкретного образца (раздел **Б.1**).

В разделе **Б.2** описан протокол препаративной амплификации необходимого количества дц-кДНК для дальнейших экспериментов.

2. В состав набора входит контрольный образец амплифицированной кДНК (контрольный образец кДНК-1 для электро-фореза), сравнение с которым позволит определить оптимальное количество циклов ПЦР. При работе с контрольным образцом кДНК остерегайтесь контаминации этим материалом других компонентов набора и экспериментальных образцов.

3. Используйте первую цепь, полученную с контрольной РНК матрицы, для положительного контроля ПЦР.

4. Параметры ПЦР в приведенном протоколе оптимизированы для амплификатора MJ Research PTC-200 DNA. Оптимальные параметры могут варьировать в зависимости от модели амплификатора и объема реакционной смеси.

B1. Предварительная аналитическая амплификация

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке *:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 мкМ)
1 мкл	50X Encyclo полимеразы
1 мкл	Первая цепь кДНК (со стадии A.10) **
50 мкл	Суммарный объем

* Аналитическая реакционная смесь готовится для каждого образца в объеме 50 мкл, после чего разделяется на 3 аликвоты по 16 мкл.

При одновременной работе с несколькими образцами первой цепи кДНК, приготовьте общую реакционную смесь, содержащую все указанные компоненты, кроме ДНК матрицы; разнесите по 49 мкл в новые стерильные пробирки и после этого добавьте к каждой аликвоте по 1 мкл первой цепи кДНК со стадии **A.10**.

** Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, хранившийся при -20°C, должен быть прогрет при 65°C в течение 1 мин. После прогревания аккуратно перемешайте содержимое пробирки.

Если вы планируете осуществить препаративную наработку дц-кДНК сразу после предварительной амплификации, сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на льду при 0 - +4°C. В ином случае заморозьте её на -20°C.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Приготовьте реакционную смесь в объеме 50 мкл, разделите на аликвоты по 16 мкл в 0.2-мл или 0.5-мл стерильные пробирки для ПЦР. Для каждого образца обозначьте пробирки как <S>1, <S>2, и <S>3, где <S> – идентификатор образца первой цепи.

Примечание. Мы рекомендуем использовать тонкостенные 0.2-мл пробирки для ПЦР, так как это позволяет достичь большей эффективности реакции.

4. Добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Примечание. Так как в данном протоколе использованы малые (20-30 мкл) объемы для ПЦР, мы рекомендуем добавлять масло даже в случае, если ваш амплификатор имеет нагревающую крышку.

5. Осуществите амплификацию по следующей схеме:

Стадия	Количество циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	1 мин
Циклы ПЦР	N*	95°C	15 сек
		66°C	20 сек
		72°C	3 мин

* N – число циклов ПЦР зависит от количества РНК, использованной для синтеза первой цепи кДНК (см. **Таблицу 1**).

Таблица 1. Количество циклов ПЦР для предварительной амплификации

Количество тотальной РНК	Количество полиА+ РНК	Циклов ПЦР для образца		
		<S>1	<S>2	<S>3
1.0-2.0 мкг	0.5-1.0 мкг	13-14	16-17	18-20
0.5-1.0 мкг	0.1-0.5 мкг	14-15	17-18	20-21
0.1-0.5 мкг	0.1 мкг и менее	16-17	20-21	23-24

6. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2 % агароза, ТАЕ буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 4 мкл контрольного образца кДНК-1 для гель-электрофореза и 0.1 мкг ДНК-маркера. Если продукт ПЦР был заморожен, прогрейте его перед нанесением на гель при 72°C в течение 1 мин и перемешайте содержимое пробирки.

7. Сравните результат гель-электрофореза полученных образцов кДНК с готовым контрольным образцом кДНК и с результатом электрофореза, приведенным на **рис. 3**. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца исходя из следующих рекомендаций.

а. Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция вышла на плато. Оптимальное для амплификации образца количество циклов должно быть на 1-2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато;

б. При оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при анализе на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики (б1, б2).

б1. Шмер умеренной интенсивности и ожидаемой длины

Для кДНК млекопитающих общая интенсивность шмера должна примерно соответствовать той, которую имеют образцы кДНК, показанные дорожках 2-3 на рис. 3 (сравнение относительно интенсивности маркера). Если интенсивность шмера не нарастает

с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4 рис. 3), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации.

Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1 рис. 3), значит, количество циклов ПЦР было недостаточно для амплификации этого образца.

Если верхняя граница шмера существенно ниже ожидаемой (например, меньше 2 т.п.н. для кДНК из тканей млекопитающих), возможно, исходная РНК имела низкое качество или деградировала в процессе хранения или синтеза кДНК.

Примечание. Для большинства образцов из тканей млекопитающих кДНК, обогащенная полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0.5 до 6 т.п.н. кДНК из других организмов может иметь меньший размер, например до 3 т.п.н.

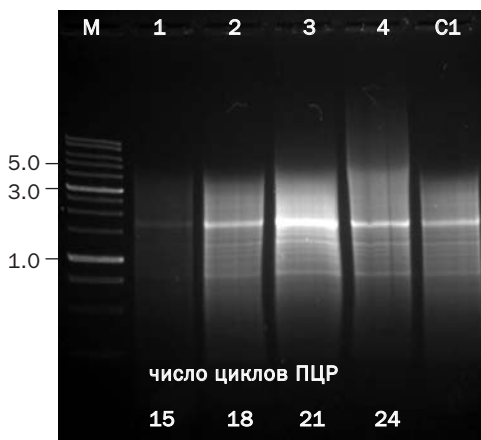


Рис. 3. Результат гель-электрофореза на агарозе (1.2%) амплифицированной дц-кДНК, полученной с контрольной РНК.

Количество циклов ПЦР указано под дорожками. М – 1 kb ДНК-маркер (Сибэнзим, Россия). С1 – контрольный образец ДНК-1 (1 мкг).

Примечание. В этом эксперименте на старт синтеза первой цепи кДНК был взят 1 мкг контрольной тотальной РНК. По 4 мкл продукта ПЦР было нанесено на 1.2% агарозный гель после 15, 18, 21 и 24 циклов ПЦР параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. В приведенном эксперименте после 21 цикла ПЦР в продукте ПЦР наблюдается появление высокомолекулярной фракции, что свидетельствует об избыточной амплификации. Так как реакция выходит на плато после 20 циклов ПЦР, оптимальным для амплификации данного образца является использование 18-19 циклов ПЦР.

62. Наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

кДНК из тканей млекопитающих, как правило, имеет несколько ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам. Выраженность полос зависит от параметров гель-электрофореза, источника РНК и т.д. Шмер, частично смещенный к лунке, с размытыми или отсутствующими характерными полосами, свидетельствует об избыточной амплификации образца кДНК.

Слабовыраженные полосы на фоне малоинтенсивного шмера свидетельствует о недостаточном количестве циклов ПЦР. Если все образцы (<S>1-<S>3) были подвергнуты недостаточному количеству циклов ПЦР, добавьте 2-3 дополнительных цикла и повторите анализ на гель-электрофорезе.

Примечание. Репрезентативность образца амплифицированной кДНК зависит от количества молекул кДНК, взятых на старт амплификации. Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов.

62. Препаративная наработка дц-кДНК

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке*:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 μM)
1 мкл	50X Encyclo полимеразы
49 мкл	Суммарный объем

* Количества указаны для амплификации одного образца первой цепи кДНК в объеме 50 мкл. В этом объеме возможно наработать 200-500 нг кДНК (при оптимальных условиях, амплифицированный образец имеет концентрацию кДНК 5-10 нг/мкл). При использовании иного объема ПЦР или приготовлении общей реакционной смеси для нескольких образцов количество компонентов необходимо пропорционально увеличить. Необходимо учесть возможные потери на 20-30% при очистке продукта ПЦР.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Распределите реакционную смесь по 49 мкл в отдельные 0.2-мл или 0.5-мл пробирки для ПЦР.

4. Добавьте в каждую пробирку по 1 мкл первой цепи кДНК (со стадии **A.10**). Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на -20°C.

Примечание. Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, хранившийся при -20°C, должен быть прогрет при 65°C в течение 1 мин и перемешан встряхиванием.

5. Если Ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.

6. Осуществите амплификацию, используя следующую инструкцию:

Стадия	Количество	Температура циклов	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	1 мин
Циклы ПЦР	N*	95°C 66°C 72°C	15 сек 20 сек 3 мин
Финальная элонгация	1	66°C 72°C	20 сек 3 мин

* N – количество циклов ПЦР, определенное как оптимальное для данного образца как описано в **разделе Б.1**.

7. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2 % агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку). Используйте 50-100 нг 1 kb ДНК-маркера на дорожку.

Продукт ПЦР хранится при -20°C до одного года.

Примечание. Продукт ПЦР может быть использован для ненаправленного клонирования библиотеки кДНК в TA-вектор (например в rAL-TA вектор, Евроген, кат. TA001). Для эффективного лигирования свежий продукт ПЦР необходимо быстро очистить с помощью коммерческих наборов или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом. Для лигирования в TA-вектора можно использовать только свежеприготовленную кДНК.

Примечание. После хранения реакционной смеси в холодильнике её можно клонировать по “тупым концам” в любой вектор. Для клонирования по “тупым концам” следует провести процедуру “полировки” (polishing).

Примечание. Полученная кДНК может быть также использована для псевдо-Нозерн блота, супрессионной вычитающей гибридизации (см. протокол Clontech SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, PT3041-1, Section VIII. Protocol for PCR-Select™ cDNA Subtraction), для кДНК нормализации с помощью набора Trimmer (Евроген, кат. NK001) или как матрица для ПЦР.

VII. Протокол-2: синтез кДНК для направленного клонирования

A. Синтез первой цепи и введение PlugOligo-3M

Для инкубации реакционной смеси используйте ПЦР-амплификатор. Использование воздушного термостата требует дополнительной оптимизации протокола.

Внимательно прочитайте протокол перед началом работы!

1. Для каждого образца РНК приготовьте первую часть реакционной смеси (в пробирке на 0.2 мл или 0.5 мл), добавляя реагенты в указанном порядке:

х мкл	Стерильная вода
1-3 мкл	Раствор РНК (0.25 - 2 мкг РНК)* Для положительного контроля используйте 2 мкл контрольной тотальной РНК, входящей в состав набора Mint-Universal
1 мкл	CDS-3M праймер (10 мкМ)
1 мкл	PlugOligo-3M адаптор
5 мкл	Суммарный объем первой части реакционной смеси

* Для предотвращения агрегации РНК, перед взятием аликвот прогрейте образец РНК при 65°C в течение 1-2 мин, перемешайте содержимое и сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Если ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку для предотвращения испарения реакционной смеси.

4. Закройте пробирки и поместите их в амплификатор.

5. Для денатурации РНК запустите инкубацию пробирок при 70°C в течение 2 мин (используйте нагревающуюся крышку, если это возможно). По истечении времени прогрева снизьте температуру инкубации до 42°C, не вынимая пробирки из амплификатора.

Убедитесь, что температура пробирок снизилась до 42°C, после чего добавьте вторую часть реакционной смеси.

Примечание. Пока пробирки нагреваются, выполните стадию 6.

Продолжайте инкубацию при 42°C не менее 1-3 мин до добавления второй части реакционной смеси (см. **стадию 6**).

6. Во время инкубации, описанной на стадии 5, приготовьте вторую часть реакционной смеси, смешивая реагенты в указанном порядке:

Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

2 мкл	5X Буфер для синтеза первой цепи
1 мкл	DTT (20 mM)
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
1 мкл	Mint ревертаза
5 мкл	Суммарный объем второй части реакционной смеси

Примечание. При необходимости, во вторую часть реакционной смеси может быть добавлен ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion) из расчета 0.5 мкл на реакцию.

7. Аккуратно перемешайте компоненты пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

8. Быстро добавьте по 5 мкл полученной смеси в каждую пробирку с реакционной смесью **со стадии 5**. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

9. Инкубируйте пробирки при 42°C в течение 30 мин, после чего добавьте в каждую пробирку по 5 мкл IP-смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Продолжайте инкубацию при 42°C в течение 1 ч 30 мин.

Примечание. Не держите пробирки с реакционной смесью на комнатной температуре дольше, чем это необходимо, чтобы добавить IP-смесь.

10. После завершения инкубации поместите пробирки в лед для остановки реакции.

Примечание. В ходе реакции на дне пробирок может сформироваться бурый осадок. Он не мешает синтезу и хранению кДНК.

Полученная первая цепь кДНК может быть использована немедленно для приготовления дц-кДНК (раздел VI.Б) или храниться при -20°C в течение 3 месяцев.

Б. Амплификация дц-кДНК

Важные замечания:

1. Использование оптимального количества циклов в ПЦР при амплификации кДНК очень важно для большинства приложений. Избыточное количество циклов ПЦР приводит к накоплению неспецифического продукта ПЦР и может существенно исказить результаты экспериментов. При недостаточном количестве циклов ПЦР получается небольшое количество амплифицированной кДНК. Оптимальное число циклов ПЦР определяется пользователем и зависит от природы экспериментальных образцов. Мы включили в протокол стадию аналитической амплификации в небольшом объеме реакционной смеси, которая нужна для оптимизации числа циклов в случае каждого конкретного образца (**раздел Б.1**).

В разделе Б.2 описан протокол препаративной амплификации необходимого количества дц-кДНК для дальнейших экспериментов.

2. В состав набора входит контрольный образец амплифицированной кДНК (контрольный образец кДНК-2 для электрофореза), сравнение с которым позволит определить оптимальное количество циклов ПЦР. При работе с контрольным образцом кДНК остерегайтесь контаминации этим материалом других компонентов набора и экспериментальных образцов.

3. Используйте первую цепь, полученную с контрольной РНК матрицы, для положительного контроля ПЦР.

4. Параметры ПЦР в приведенном протоколе оптимизированы для амплификатора MJ Research PTC-200 DNA. Оптимальные параметры могут варьировать в зависимости от модели амплификатора и объема реакционной смеси.

B1. Предварительная аналитическая амплификация

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке *:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 μM)
1 мкл	50X Encyclo полимеразы
1 мкл	Первая цепь кДНК (со стадии A.10) ^{2,3}
50 мкл	Суммарный объем

* Аналитическая реакционная смесь готовится для каждого образца в объеме 50 мкл, после чего разделяется на 3 аликвоты по 16 мкл.

При одновременной работе с несколькими образцами первой цепи кДНК, приготовьте общую реакционную смесь, содержащую все указанные компоненты, кроме ДНК матрицы; разнесите по 49 мкл в новые стерильные пробирки и после этого добавьте к каждой аликвоте по 1 мкл первой цепи кДНК со стадии **A.10**.

** Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, который хранили при -20°C, должен быть прогрет при 65°C в течение 1 мин. После прогревания аккуратно перемешайте содержимое пробирки.

Если вы планируете осуществить препаративную наработку дц-кДНК сразу после предварительной амплификации, сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на льду при 0 - +4°C. В ином случае заморозьте её на -20°C.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Приготовьте реакционную смесь в объеме 50 мкл, разделите на аликвоты по 16 мкл в 0.2-мл или 0.5-мл стерильные пробирки для ПЦР. Для каждого образца обозначьте пробирки как <S>1, <S>2, и <S>3, где <S> – идентификатор образца первой цепи.

Примечание. Мы рекомендуем использовать тонкостенные 0.2-мл пробирки для ПЦР, так как это позволяет достичь большей эффективности реакции.

4. Добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Примечание. Так как в данном протоколе использованы малые (20-30 мкл) объемы для ПЦР, мы рекомендуем добавлять масло даже в случае, если ваш амплификатор имеет нагревающую крышку.

5. Осуществите амплификацию по следующей схеме:

Стадия	Количество циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	1 мин
Циклы ПЦР	N*	95°C	15 сек
		66°C	20 сек
		72°C	3 мин

* N – число циклов ПЦР зависит от количества РНК, использованной для синтеза первой цепи кДНК (см. **Таблицу 2**).

6. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2 % агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с 4 мкл контрольного образца кДНК-2 для гель-электрофореза и 0.1 мкг ДНК-маркера.

Таблица 2. Количество циклов ПЦР для предварительной амплификации

Количество тотальной РНК	Количество полиА+ РНК	Циклов ПЦР для образца		
		<S>1	<S>2	<S>3
1.0-2.0 мкг	0.5-1.0 мкг	14-15	17-18	20-21
0.5-1.0 мкг	0.1-0.5 мкг	15-16	18-19	21-22
0.1-0.5 мкг	0.1 мкг и менее	17-18	20-21	23-24

Если продукт ПЦР был заморожен, прогрейте его перед нанесением на гель при 72°C в течение 1 мин и перемешайте содержимое пробирки.

7. Сравните результат гель-электрофореза полученных образцов кДНК с готовым контрольным образцом кДНК и с результатом электрофореза, приведенным на **рис. 4**. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца исходя из следующих рекомендаций.

а. отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция вышла на плато. Оптимальное для амплификации образца количество циклов должно быть на 1-2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато;

б. при оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при анализе на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики (б1, б2).

б1. Шмер умеренной интенсивности и ожидаемой длины

Для кДНК млекопитающих общая интенсивность шмера должна примерно соответствовать той, которую имеют образцы кДНК, показанные дорожках 2-3 на рис. 4 (сравнение относительно интенсивности маркера). Если интенсивность шмера не нарастает с увеличением циклов ПЦР и смещена к лунке (например, как на дорожке 4 рис. 4), значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации. Если интенсивность шмера существенно ниже (например, как на дорожке 1 рис. 4),

значит, количество циклов ПЦР было недостаточно для амплификации этого образца.

Если верхняя граница шмера существенно ниже ожидаемой (например, меньше 2 т.п.н. для кДНК из тканей млекопитающих), возможно, исходная РНК имела низкое качество или деградировала в процессе хранения или синтеза кДНК.

Примечание. Для большинства образцов из тканей млекопитающих кДНК, обогащенная полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0.5 до 6 т.п.н. кДНК из других организмов может иметь меньший размер, например до 3 т.п.н.

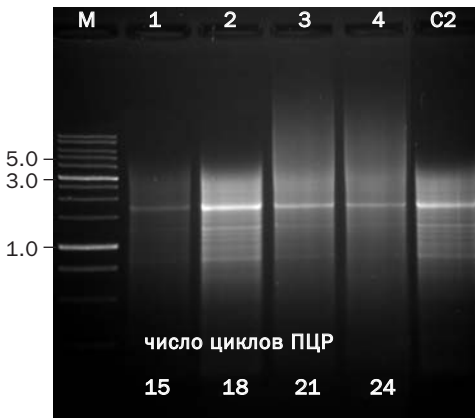


Рис. 4. Результат гель-электрофореза на агарозе (1.2%) амплифицированной дц-кДНК, полученной с контрольной РНК.

Количество циклов ПЦР указано под дорожками. М – 1 kb ДНК-маркер (Сибэнзим, Россия). С2 – контрольный образец ДНК-2 (1 мкг).

Примечание. В этом эксперименте на старт синтеза первой цепи кДНК был взят 1 мкг контрольной тотальной РНК. По 4 мкл продукта ПЦР было нанесено на 1.2% агарозный гель после 15, 18, 21 и 24 циклов ПЦР параллельно с 0.1 мкг маркера длин ДНК. В приведенном эксперименте после 21 цикла ПЦР в продукте ПЦР наблюдается появление высокомолекулярной фракции, что свидетельствует об избыточной амплификации. Так как реакция выходит на плато после 19-20 циклов ПЦР, оптимальным для амплификации данного образца является использование 18 циклов ПЦР.

62. Наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

кДНК из тканей млекопитающих, как правило, имеет несколько ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам.

Выраженность полос зависит от параметров гель-электрофореза, источника РНК и т.д. Шмер, частично смещенный к лунке, с размытыми или отсутствующими характерными полосами, свидетельствует об избыточной амплификации образца кДНК.

Слабовыраженные полосы на фоне малоинтенсивного шмера свидетельствует о недостаточном количестве циклов ПЦР.

Если все образцы (<S>1-<S>3) были подвергнуты недостаточно количеству циклов ПЦР, добавьте 2-3 дополнительных цикла и повторите анализ на гель-электрофорезе.

Примечание. Репрезентативность образца амплифицированной кДНК зависит от количества молекул кДНК, взятых на старт амплификации. Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов.

В2. Препаративная наработка дц-кДНК

1. Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке*:

40 мкл	Стерильная вода
5 мкл	10X Encyclo буфер для ПЦР
1 мкл	Смесь dNTP (10 mM)
2 мкл	ПЦР праймер M1 (10 μM)
1 мкл	50X Encyclo полимеразы
49 мкл	Суммарный объем

* Приведенные количества указаны для амплификации одного образца первой цепи кДНК в объеме 50 мкл. В этом объеме возможно наработать 200-500 нг кДНК (при оптимальных условиях амплифицированный образец имеет концентрацию кДНК 5-10 нг/мкл). При использовании иного объема ПЦР или приготовлении общей реакционной смеси для нескольких образцов количество компонентов необходимо пропорционально увеличить. Необходимо учесть возможные потери на 20-30% при очистке продукта ПЦР.

2. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

3. Распределите реакционную смесь по 49 мкл в отдельные 0.2-мл или 0.5-мл пробирки для ПЦР.

4. Добавьте по 1 мкл первой цепи кДНК (со стадии **A.10**) к каждой реакционной смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге. Сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на -20°C.

Примечание. Перед взятием аликвоты образец первой цепи кДНК, хранившийся при -20°C, должен быть прогрет при 65°C в течение 1 мин и перемешан встряхиванием.

5. Если Ваш амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.

6. Осуществите амплификацию, используя следующую инструкцию:

Стадия	Количество	Температура циклов	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	1 мин
Циклы ПЦР	N*	95°C	15 сек
		66°C	20 сек
		72°C	3 мин
Финальная элонгация	1	66°C	20 сек
		72°C	3 мин

* N – количество циклов ПЦР, определенное как оптимальное для данного образца как описано в **разделе Б.1**.

7. По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2 % агароза, TAE буфер, окраска EtBr, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку). Используйте 50-100 нг 1 kb ДНК-маркера на дорожку.

Продукт ПЦР хранится при -20°C до одного года.

Примечание. Продукт ПЦР может быть использован для направленного клонирования библиотеки кДНК по сайтам рестрикции *Sfi* A и *Sfi* B. Для Перед клонированием библиотеки рекомендуется осуществить очистку продукта ПЦР с помощью специальных коммерческих наборов или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом. Качество библиотеки будет выше, если перед клонированием кДНК будет подвергнута процедуре фракционирования по длинам с помощью колонок Chroma Spin-400 или Chroma Spin-1000 (Clontech) или их аналогов.

Примечание. Полученная кДНК имеет ограничения для использования в качестве матрицы для трансляции белков, так как она может иметь стоп-кодоны в 5'-некодирующей части. Рекомендуется использовать векторы со смещением стартового АТГ для преодоления этой проблемы.

Примечание. Перед клонированием кДНК может быть нормализована с помощью набора Trimmer-Direct (Евроген, кат. NK002).

VIII. Решение проблем

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
А. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в положительном контроле	<p>РНК могла деградировать во время хранения или реакции синтеза первой цепи</p>	<p>Используйте одноразовые перчатки, стерильные наконечники для пипеток. Убедитесь, что ваши реагенты, рабочая зона и инструментарий не загрязнены нуклеазами. Проверьте качество РНК на денатурирующем геле-электрофорезе. Если вы подозреваете, что проблема — деградация РНК в ходе синтеза, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion).</p>
	<p>Ошибка в процессе работы</p>	<p>Проверьте, не была ли допущена ошибка в процессе работы. Повторите синтез кДНК, используя новую порцию контрольной РНК. Убедитесь, что РНК была прогрета и перемешена перед взятием аликвоты.</p>
	<p>Использованы неоптимальные параметры ПЦР</p>	<p>Оптимальные параметры ПЦР зависят от амплификатора, времени хранения ферментов, природы РНК. Если ПЦР выходит на плато через 25 циклов и более, возможно, вы используете неоптимальные параметры ПЦР. Попробуйте повторить амплификацию, используя новую порцию первой цепи кДНК и варьируя температуру отжига праймеров с шагом 2-4°C и/или температуру денатурации с шагом 1°C. Если Вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: <i>customer-support@evrogen.ru</i></p>

<p>Б. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в экспериментальных образцах.</p>	<p>Экспериментальная РНК деградирована или имеет низкую концентрацию</p>	<p>Проверьте качество и концентрацию РНК на денатурирующем гель-электрофорезе. Проверьте стабильность РНК, инкубируя аликвоту РНК при 42°C в течение 1 ч, после чего проверьте её качество на гель-электрофорезе, сравнив с неинкубированной РНК. Если РНК деградировала во время инкубации, повторите выделение РНК другим методом или проведите дополнительную очистку РНК с помощью нескольких последовательных экстракций фенолом – хлороформом. Повторите синтез кДНК с новой порцией РНК. Если вы подозреваете, что проблема – деградация РНК в ходе синтеза кДНК, добавьте в реакцию синтеза первой цепи ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor, 20 ед/мкл, Ambion).</p>
	<p>Образцы РНК могут содержать нежелательные добавки, ингибирующие синтез кДНК</p>	<p>В ряде случаев переосаждение РНК этанолом, хлоридом лития или дополнительная очистка с помощью коммерческих наборов позволяет избавиться от нежелательных примесей. Если переосаждение не помогает, используйте иной метод выделения РНК.</p>

В. Продукт ПЦР хорошего качества, но низкой концентрации	Недостаточно число циклов ПЦР	Увеличьте число циклов ПЦР, добавив 2-3 дополнительных цикла (плюс финальная элонгация). Если увеличение количества циклов не приводит к увеличению выхода ПЦР, повторите амплификацию, изменив количество первой цепи (уменьшить или увеличить в 2 раза). Если концентрация продукта ПЦР остается недостаточной, повторите синтез первой цепи, используя большее количество РНК на старте. Если амплификация образца кДНК требует более 25 циклов, такой образец может не содержать редких транскриптов.
Г. При анализе на гель-электрофорезе отсутствуют яркие полосы, основная плотность кДНК смещена в верхнюю часть шмера, иногда доходит до лунки	Избыточное число циклов ПЦР	Повторите ПЦР со свежей порцией первой цепи кДНК, уменьшив число циклов на 2-3. Анализ кДНК из некоторых тканей (например, мозг, тимус, селезенка млекопитающих) может не выявлять ярких полос.
	Неправильные параметры электрофореза	Степень визуализации кДНК может зависеть от параметров гель-электрофореза. Используйте следующие параметры: 1X TAE буфер, концентрация агарозы 1.1%-1.5%, рабочее напряжение не более 10 V/см (10V на каждый см длины между электродами).
	Произошла контаминация образца амплифицированной ДНК	Проведите контрольную ПЦР без добавления матрицы. В случае появления продукта ПЦР в ходе контрольной ПЦР смените все реактивы и проведите очистку пипеток и рабочей зоны от загрязнения.

IX. Приложение А

Рекомендации по проведению неденатурирующего гель-электрофореза РНК

1. Рекомендуемые условия:

- используйте 1X TAE буфер (не 1X TBE);
- используйте агарозу в концентрации 1.1%-1.2%;
- добавляйте бромистый этидиум (EtBr) в гель и буфер для электрофореза, избегайте дополнительных стадий окрашивания;
- используйте только свежеприготовленный гель и буфер, а также чистое оборудование для электрофореза;
- используйте перчатки при постановке электрофореза;
- используйте рабочее напряжение не более 10 V/см (10V на каждый см длины между электродами).

2. Перед нанесением аликвот РНК на гель, прогрейте их при 70°C в течение 1 мин и поместите на лед.

3. Наносите параллельно с тестируемыми образцами известное количество маркера длин ДНК или РНК как стандарта для определения концентрации РНК. Концентрация тотальной РНК может быть грубо оценена по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК, так как инкорпорация EtBr в рРНК и ДНК имеет сходную эффективность.

4. Первым признаком деградации РНК на неденатурирующем гель-электрофорезе служит появление слабого шмера от полос рРНК в сторону фронта и изменение соотношения интенсивности полос 28S/18S рРНК в пользу 18S. РНК с такой степенью деградации может быть использована для синтеза кДНК для большинства приложений. Однако, если шмер от низкомолекулярной фракции РНК столь интенсивен, что полоса рРНК не имеет выраженной нижней границы, то такая РНК не пригодна для синтеза кДНК.

X. Ссылки

Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12): 6025-6030.

Diatchenko L., Lukyanov S., Lau Y.F., Siebert P.D. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303: 349-380.

Franz O., Bruchhaus I.I., Roeder T. 1999. Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res.* 27: e3.

Ishikawa H. 1977. Evolution of ribosomal RNA. *Comp. Biochem. Physiol. B* 58: 1-7

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schmidt W.M., Mueller M.W. 1999. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 27(21): e31.

Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Shcheglov A.S., Vagner L.L., Khaspekov G.L., Kozhemyako V.B., Matz M.V., Meleshkevitch E., Moroz L.L., Lukyanov S.A., Shagin D.A. 2004. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acid Res.* 32: e37.

Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Shcheglov A.S., Shagina I.A., Wagner L.L., Khaspekov G.L., Kozhemyako V.B., Lukyanov S.A., Shagin D.A. 2005. A method for the preparation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 31 (2): 170-177.

Другие продукты и сервисы компании Евроген

А. Продукты

1. Реактивы для синтеза кДНК: набор реактивов MINT, обратная транскриптаза MINT.
2. Реактивы для ПЦР: наборы “Encyclo PCR kit” и “Tersus PCR kit”, Taq ДНК полимеразы, SNPdetect полимеразы, готовые смеси для ПЦР: ScreenMix, ScreenMix-HS, qPCRmix-HS.
3. Реактивы для нормализации кДНК: наборы Trimmer и Trimmer-direct.
4. Соосадитель нуклеиновых кислот Satellite red.
5. Наборы для выделения и очистки ДНК.
6. Дуплекс-специфичная нуклеаза.

Б. Сервисы

1. Синтез генов / праймеров.
2. Сайт-направленный мутагенез.
3. Секвенирование.
4. Приготовление библиотек кДНК.
5. Нормализация кДНК.
6. Вычитающая гибридизация кДНК.
7. Вычитание бактериальных геномов.
8. Амплификация и клонирование ДНК и кДНК.

Евроген

117997 г. Москва
ул. Миклухо-Маклая 16/10

Тел: +7(495) 988 4084

Факс: +7(495) 988 4085

www.evrogen.ru