



MINT

Набор реактивов для синтеза кДНК

Номер по каталогу SK001

Инструкция по применению

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

Оглавление

I. Назначение	1
II. Метод	1
III. Состав и условия хранения	3
IV. Важные рекомендации и замечания	4
V. Требования к РНК	6
VI. Протокол синтеза кДНК	8
VII. Решение проблем	19
VIII. Приложение А	
Рекомендации по проведению неденатурирующего гель-электрофореза РНК	22
IX. Ссылки	23
X. Другие продукты и сервисы компании Евроген	24

I. Назначение

Набор реактивов “MINT” 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 ненаправленных библиотек кДНК, 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).

Ограничения к применению:

Набор реактивов Mint 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, 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.

2 II. Метод ...продолжение

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 3'-праймера, а с другой - последовательностью, комплементарной PlugOligo.

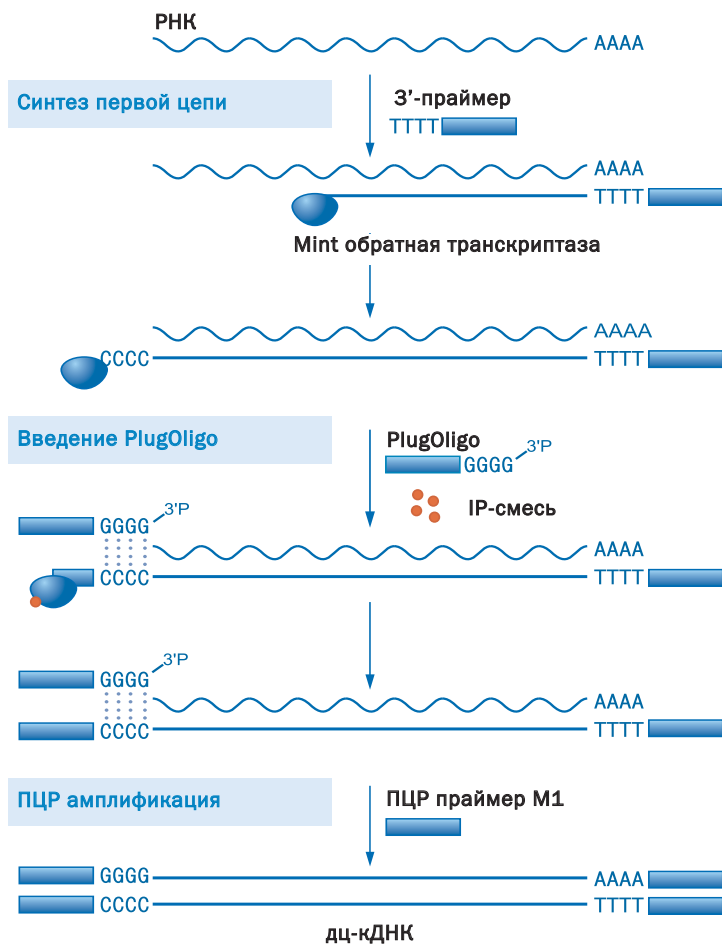


Рис. 1. Схема синтеза кДНК с использованием набора реактивов MINT

Первую цепь кДНК амплифицируют в ПЦР с праймером M1, соответствующим внешней части PlugOligo и 3'-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.

III. Состав и условия хранения

A. Список компонентов (на 20 реакций)

Компонент *	Количество
5X буфер для синтеза первой цепи (5X First-Strand Buffer)	80мкл
DTT (20 мМ)	30 мкл
Смесь dNTP (dNTP mix, 10 мМ каждого)	80 мкл
PlugOligo адаптер (PlugOligo adapter, 15 мкМ)** 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT <u>AC</u> GGGGG-P-3'	25 мкл
3'-праймер (3'-primer, 10 мкМ)** 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT <u>AC</u> (T)30VN -3'	25 мкл
Ревертаза (Mint Reverse Transcriptase)	20 мкл
IP-смесь (IP-solution)	130 мкл
Контрольная тотальная РНК (Control total RNA, 0.5 мкг/мкл)	15 мкл
ПЦР праймер M1 (PCR Primer M1, 10 мкМ) 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	100 мкл
50X смесь Encyclo (50X Encyclo polymerase mix)	50 мкл
10X Encyclo буфер (10X Encyclo buffer)	300 мкл
Стерильная вода (Sterile RNase free water)	1,8 мл

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

**Сайт эндонуклеазы рестрикции *Rsa* I подчеркнут; N = A, C, G или T; V = A, G или C

Все компоненты хранить при -20°C

4 III. Состав и условия хранения ...продолжение

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 (ДНК-маркер 1kb)

IV. Важные рекомендации и замечания

Пожалуйста, ознакомьтесь перед началом работы

1. 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:

(1) смешивать реагенты для синтеза кДНК в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и РНК и анализа продуктов ПЦР;

(2) использовать для работы наконечники для автоматических пипеток, имеющие гидрофобный фильтр;

(3) для мониторинга уровня контаминации включать отрицательный контроль (в реакцию вместо ДНК или РНК-матрицы добавлять стерильную воду) в каждый эксперимент;

(4) Использовать стерильные одноразовые перчатки.

2. Положительный контроль

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

3. 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 уменьшить вариации в количестве различных компонентов 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. Предлагаемый ниже протокол позволяет синтезировать дц-кДНК на матрице полиА⁺ РНК или тотальной РНК. 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 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 реагентов RNeasy kits (QIAGEN).

3. После выделения РНК мы рекомендуем провести оценку ее качества с помощью гель-электрофореза на агарозе. Можно использовать денатурирующий формальдегидный электрофорез как описано в (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 kb.

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

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 протяженным молекулам.

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 в 12M LiCl или фенол-хлороформной экстракцией.

VI. Протокол синтеза кДНК

A. Синтез первой цепи и введение PlugOligo

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
1 мкл	3'-праймер (10 мкМ)
1 мкл	PlugOligo
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.

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

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. Добавьте по 5 мкл полученной РС2 в каждую пробирку с реакционной смесью со стадии 5. РС2 рекомендуется добавлять быстро, в течение 1-3 мин. после снижения температуры до 42°C. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, при необходимости сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

10 VI. Протокол синтеза кДНК ...продолжение

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. и 30 мин.

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 (0 - +4°C) для остановки реакции.

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 ряда приложений, таких как псевдо-Нозерн блот (Franz *et al.*, 1999) или супрессионная вычитающая гибридизация (Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999). Избыточное количество циклов ПЦР приводит к накоплению неспецифического продукта ПЦР и может существенно искажать результаты экспериментов. При недостаточном количестве циклов ПЦР получается небольшое количество амплифицированной кДНК. Оптимальное число циклов ПЦР определяется индивидуально конечным 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 Б1).

В разделе Б2 описан протокол препаративной амплификации необходимого количества дц-кДНК для дальнейших экспериментов.

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

3. 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.

Б1. 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 А.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, рекомендуется приготовить общую реакционную смесь, содержащую все указанные компоненты, кроме ДНК матрицы, после чего разнести по 49 мкл в новые стерильные пробирки и после этого добавить к каждой аликвоте по 1 мкл первой цепи кДНК со стадии А.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.

12 VI. Протокол синтеза кДНК ...продолжение

Если вы планируете осуществить 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 алиquotы 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.

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.

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

5. Осуществите амплификацию, используя следующую инструкцию:

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 - количество ПЦР циклов для каждого из образцов <S>1, <S>2, и <S>3, как показано в **Табл. 1** для определенного количества РНК, использованного на старте синтеза первой цепи.

Таблица 1. Количество циклов ПЦР для предварительной амплификации

Количество тотальной РНК	Количество полиА* РНК	Циклов ПЦР для образца		
		<S>1	<S>2	<S>3
2.0 мкг	0.5-1.0 мкг	13-14	16-17	18-20
1.0-2.0 мкг	0.25-0.5 мкг	14-15	17-18	20-21
0.5-1.0 мкг	0.1-0.25 мкг	15-16	18-19	21-22
0.25-0.5 мкг	0.1 мкг	17-18	20-21	23-24

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 0.1 мкг 1 kb ДНК- маркера.

Продукт ПЦР можно хранить при -20°C до трех месяцев и более. Перед нанесением продукта ПЦР на гель после хранения и размораживания, прогрейте его при 72°C в течение 1 мин и перемешайте содержимое пробирки.

7. Сравните результат гель-электрофореза с приведенным на **Рис. 2**. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца исходя из следующих рекомендаций:

- 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.
- При оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при анализе на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики:

(а) шмер умеренной интенсивности ожидаемой длины

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

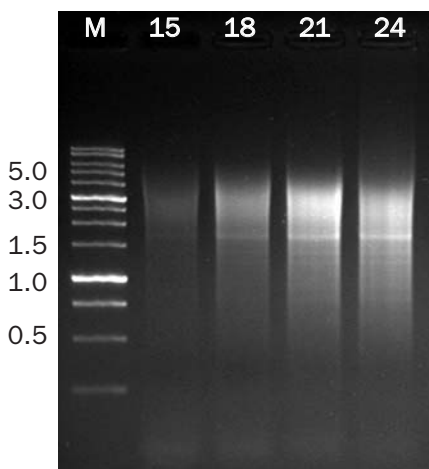


Рисунок 2. Результат гелелектрофореза на агарозе (1.2%) амплифицированной дц-кДНК, полученной с помощью набора Mint с контрольной РНК из мозга человека.

Количество циклов ПЦР указано над дорожками. М - 1 kb ДНК-маркер (Сибэнзим, Россия).

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.

Как правило, распределение длин молекул в образце дц-кДНК примерно соответствует распределению длин в образце исходной РНК. 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).

(б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам

На Рис. 2 приведен результат амплификации кДНК из мозга человека. Вследствие высокой сложности полиА⁺ фракции мозговой РНК, эта кДНК не имеет ярких полос. Сходный паттерн имеет кДНК из селезенки и вилочковой железы (тимуса). кДНК из других тканей, как правило, имеет несколько ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам (Рис. 3).

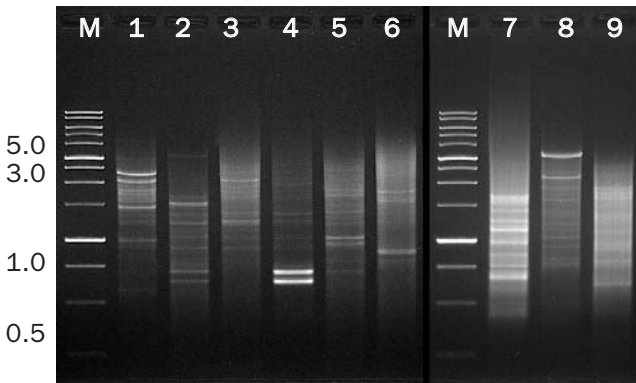


Рисунок 3. Результат гель-электрофореза на агарозе (1.2%) образцов кДНК из различных источников, приготовленных с помощью набора Mint:

1 - печень мыши; 2 - скелетная мышца мыши; 3 - мозг мыши; 4 - лейкоциты человека; 5 - легкое человека; 6 - скелетная мышца человека; 7 - личинка комара; 8 - копепода *Pontella sp.*; 9 - лист томата *Lycopersicon esculentum*. М - 1 kb маркер длин ДНК (Сибэнзим, Россия).

Шмер, частично смещенный к лунке, с размытыми или отсутствующими характеристическими полосами, свидетельствует об избыточной амплификации образца кДНК.

16 VI. Протокол синтеза кДНК ...продолжение

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

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

Репрезентативность образца амплифицированной кДНК зависит от количества молекул кДНК, взятых на старт амплификации. Следовательно, чем меньше молекул попало в реакционную смесь, тем больше циклов ПЦР потребуется для амплификации необходимого количества кДНК. Если для амплификации образца кДНК потребовалось больше 25 циклов, это означает, что образец кДНК может не содержать редких транскриптов.

Б2. 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 нгр кДНК. Определите, какое количество дц-кДНК необходимо для дальнейшей работы. Обычно, при оптимальных условиях, амплифицированный образец имеет концентрацию кДНК 5-10 нгр/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 А.10) к каждой реакционной смеси. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на микроцентрифуге.

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

Сохраните оставшуюся первую цепь кДНК на -20°C.

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 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
Финальная элонгация	1	66°C	20 сек
		72°C	3 мин

*N - количество ПЦР циклов, определенное как оптимальное для данного образца как описано в разделе Б1.

18 VI. Протокол синтеза кДНК ...продолжение

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). Используйте 50-100 нг 1 kb ДНК-маркера.

Продукт ПЦР можно хранить при -20°C в течение по меньшей мере шести месяцев.

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

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).

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. Решение проблем

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
<p>А. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в положительном контроле</p>	<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) как указано в разделе VI.A.</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 субоптимальные 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. Осуществите оптимизацию параметров ПЦР (Раздел “Решение проблем”, секция Б) и повторите амплификацию, используя новую порцию первой цепи кДНК. Если Вам не удалось добиться работы набора реактивов в контрольной ПЦР, обратитесь в службу технической поддержки компании Евроген: customer-support@evrogen.ru</p>

20 VII. Решение проблем ...продолжение

Б. Оптимизация параметров ПЦР	Слишком высокая температура температура отжига	Постепенно снижайте температуру отжига с шагом 2-4°C.
	Слишком высокая или низкая температура денатурации	Постепенно снижайте/увеличивайте температуру денатурации с шагом 1°C.
В. Низкий выход продукта ПЦР, длина продукта ПЦР меньше ожидаемой, или продукт ПЦР отсутствует в экспериментальных образцах. В то же время в контроле - хорошее качество ПЦР	Экспериментальная РНК деградирована или имеет низкую концентрацию	Проверьте качество и концентрацию РНК на денатурирующем геле-электрофорезе. Проверьте стабильность РНК, инкубируя аликвоту РНК при 42°C в течение 1 ч, после чего проверьте её качество на геле-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) как указано в разделе VI.A.
	Образцы РНК могут содержать нежелательные добавки, ингибирующие синтез кДНК	В ряде случаев переосаждение РНК этанолом или LiCl позволяет избавиться от нежелательных примесей. Если переосаждение не помогает, используйте иной метод выделения РНК.

<p>Г. Продукт ПЦР хорошего качества, но низкой концентрации</p>	<p>Недостаточно число циклов ПЦР</p>	<p>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.</p>
<p>Д. При анализе на гель-электрофорезе отсутствуют яркие полосы, соответствующие частым транскриптам</p>	<p>Избыточное число циклов ПЦР</p>	<p>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</p>
	<p>Неправильные параметры электрофореза</p>	<p>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).</p>

VIII. 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.

IX. 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.

Х. Другие продукты и сервисы компании Евроген

А. ПРОДУКТЫ

1. Набор реактивов Mint-Universal для синтеза кДНК

Набор реактивов Mint-Universal предназначен для синтеза двухцепочечной (дц) кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями, с поли(A)⁺ или тотальной РНК.

Полученная дц кДНК может быть использована для приготовления как ненаправленно (протокол 1), так и направленно (протокол 2) клонированных библиотек кДНК, псевдо-Нозерн блота, супрессивной вычитающей гибридизации кДНК (SSH), нормализации кДНК с помощью наборов реактивов Trimmer (Евроген кат. NK001) или Trimmer-Direct (Евроген кат. NK002) и как матрица для ПЦР.

2. Наборы реактивов для нормализации кДНК

Нормализация кДНК позволяет существенно увеличить эффективность тотального секвенирования транскриптома.

Наборы Trimmer и Trimmer-direct предназначены для нормализации образцов двухцепочечной кДНК. После нормализации образцы кДНК имеют выравненные концентрации транскриптов, поразному представленных в исходном образце, и готовы для клонирования.

3. Дуплекс-специфическая нуклеаза краба (ДСН)

Термостабильная нуклеаза, специфичная к двухцепочечной ДНК. Может быть использована для удаления двухцепочечной ДНК из сложных смесей нуклеиновых кислот. Устойчива к прогреванию и обработке протеиназой К.

4. Набор для ПЦР “Encyclo PCR kit”

Набор реактивов "Encyclo PCR kit" содержит все необходимые компоненты для постановки 100 стандартных ПЦР амплификаций (объем 50 мкл). В основе набора - разработанная компанией Евроген смесь термостабильных ДНК полимераз Encyclo (далее Encyclo полимеразы), которая обеспечивает эффективную амплификацию широкого спектра ДНК-матриц.

Основные свойства Encyclo полимеразы:

1. Высокопроцессивная 5'>3' ДНК полимеразная активность;
2. Корректирующая 3'>5' экзонуклеазная активность;
3. Автоматический "горячий старт" (Hot Start);
4. Возможность клонирования продуктов ПЦР в Т-вектора (TA-cloning).

Encyclo полимеразы может быть использована как для простых приложений, так и для амплификации длинных фрагментов ДНК (до 15 т.п.о.), приготовления образцов тотальной кДНК, амплификации сложных ДНК-матриц.

5. pAL-TA вектор

pAL-TA вектор является аналогом известного вектора pGEM-T Easy и предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР.

Основные свойства pAL-TA вектора:

1. Клонирование продуктов ПЦР в вектор не требует предварительной обработки ДНК рестриктазами и другими ферментами;
2. Возможность клонирования как индивидуальных амплифицированных фрагментов ДНК, так и сложных смесей (например, библиотек кДНК);
3. Доступна бело-голубая селекция;
4. Возможен отбор рекомбинантных клонов путем ПЦР скрининга бактериальных колоний с использованием стандартной пары праймеров;

26 X. Другие продукты и сервисы... продолжение

5. Достигнуто оптимальное соотношение белых и синих колоний - не более 30% синих (нерекомбинантных) колоний. Около 90% белых колоний содержат рекомбинантную плазмидную ДНК (по результатам ПЦР-скрининга).

По сравнению с аналогами, рAL-TA вектор намного более стабилен при хранении и выдерживает многократное размораживание/замораживание без ощутимого снижения эффективности клонирования (общее количество трансформантов и соотношение белых и синих клонов остается практически неизменным).

6. Флуоресцентные белки

Флуоресцентные белки различных цветов для анализа генной экспрессии и мечения клеток и клеточных структур.

- Вектора для экспрессии

Коллекция векторов для (1) экспрессии флуоресцентных белков в клетках бактерий и эукариот, (2) создания флуоресцентных химерных белков и их экспрессии и (3) создания конструкций для анализа активности промоторов.

- Очищенные рекомбинантные флуоресцентные белки

- Антитела против флуоресцентных белков

Б. СЕРВИСЫ

1. Синтез ДНК / Синтез праймеров

Синтез ДНК (синтез олигонуклеотидов; флуоресцентных праймеров, генов) на синтезаторах ASM-700 и ASM-800 (Биоссет, Россия).

2. Сайт-направленный мутагенез

Внесение любых мутаций в последовательность ДНК. Соответствие целевого продукта требованиям заказчика определяется секвенированием.

3. Секвенирование

Секвенирование плазмид и ПЦР-фрагментов на автоматическом секвенаторе.

4. Приготовление библиотек кДНК

Приготовление плазмидных библиотек кДНК на основе тотальной или полиА⁺ РНК. Приготовление нормализованных и вычтенных библиотек кДНК, удаление уже известных последовательностей из популяции кДНК.

5. Нормализация кДНК

Нормализация кДНК, клонирование нормализованных кДНК в плазмидный вектор (направленно или ненаправленно).

6. Вычитающая гибридизация кДНК

Сравнение образцов кДНК методом супрессионной вычитающей гибридизации SSH. Дополнительная селекция истинно-распределенных клонов.

7. Вычитание бактериальных геномов

Сравнение геномов близкородственных штаммов бактерий методом супрессионной вычитающей гибридизации (SSH).

8. Амплификация и клонирование ДНК и кДНК

Синтез праймеров для ПЦР амплификации, амплификация фрагментов ДНК с плазмидной ДНК, геномной ДНК, амплифицированной кДНК или с первой цепи кДНК, клонирование продукта ПЦР в бактериальный вектор, проверка корректности клонирования и очистка целевой плазмиды. Субклонирование целевой вставки в вектор.

- Амплификация 5'- и 3'-концов кДНК (RACE)

Клонирование 5'- и 3'-концевых последовательностей кДНК методом Step-Out RACE при наличии известной последовательности фрагмента кДНК (не менее 30 п.о.) или пептида (не менее 10 аминокислотных остатков).

- Прогулка по хромосоме

Клонирование регуляторных (промоторных) областей генов.

Евроген

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

Тел: +7(495) 988 4084
Факс: +7(495) 988 4085

www.evrogen.ru