



## Probe Multiplex OneStep RT-qPCR kit

Zestaw Probe Multiplex OneStep RT-qPCR umożliwia przeprowadzenie jednoetapowej reakcji RT-qPCR i dokładną ocenę ilościową RNA w przypadku analizy ekspresji genów z użyciem podwójnie znakowanych sond. Zestaw zawiera unikalną odwrotną transkryptazę i wysoce wydajną polimerazę DNA tiTaq w łatwym do użycia formacie.

### Probe Multiplex OneStep RT-qPCR kit

#### Składniki zestawu

Składnik	Nr kat. E0819-01 100 reakcji 25 µl	Nr kat. E0819-02 500 reakcji 25 µl
4 x Buffer Mix *	650 µl	5 x 650 µl
Enzyme Mix	100 µl	500 µl
RNase-free Water	1500 µl	5 x 1500 µl

#### Przechowywanie: **-20°C**.

\*Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (więcej niż 4 razy), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Składnik powinien zostać zamrożony w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

#### Opis zestawu:

- 4 x Buffer Mix to uniwersalna mieszanina odczynników do przeprowadzania ilościowej reakcji RT-qPCR z użyciem sond specyficznych dla sekwencji, która może być stosowana w większości dostępnych cyklorów "real time PCR".
- Enzyme Mix zawiera unikalną, bardzo czułą odwrotną transkryptazę, polimerazę DNA tiTaq i inhibitor RNaz.
- Odwrotna transkryptaza działa w szerokim zakresie temperatur 35°-55°C bez utraty swoistości i czułości.
- Synteza cDNA i reakcja PCR przy użyciu starterów specyficznych dla genu i całkowitego RNA lub mRNA są przeprowadzane jednocześnie w jednej mieszaninie reakcyjnej.
- Polimeraza DNA tiTaq to zmodyfikowany enzym

typu „hot start”, który wykazuje bardzo silną inhibicję aktywności polimerazy w umiarkowanych temperaturach. Aktywność zostaje przywrócona podczas początkowego etapu denaturacji w temperaturze 95°C przez 2-5 minut.

- 4 x Buffer Mix zawiera dNTP.
- Dostępne są dwa warianty zestawu: bez ROX oraz z roztworem ROX (dostarczany oddzielnie). Stosowanie pasywnego barwnika referencyjnego ROX jest konieczne w przypadku cyklorów firmy Applied Biosystems i opcjonalnie w cyklorach firmy Stratagene. ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencyjnego między dołkami z powodu niewielkich różnic w objętości reakcji i fluktuacjach fluorescencji. ROX nie bierze udziału w reakcji PCR i nie zakłóca reakcji PCR. Poniższa tabela przedstawia zalecane ilości barwnika ROX (25 µM) wymagane dla konkretnego cyklera PCR.

#### Zalecane ilości barwnika ROX dla cyklorów PCR

Urządzenie	Ilość ROX na 25 µl reakcji	Końcowe stężenia barwnika ROX
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 and 7700	0.5 µl	500 nM
Applied Biosystems: 7500, ViiA 7, Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.5 µl 10 x rozcieńczony (w wodzie)	50 nM
Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nie jest wymagany	-

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039  
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

## Protokół:

Składnik reakcji	Objętość na reakcję	Stężenie końcowe
4 x Buffer Mix	6.5 µl	1 x 4 mM MgCl <sub>2</sub>
Starter 1	zmienna	0.2-0.4 µM
Starter 2	zmienna	0.2-0.4 µM
Sonda	zmienna	0.1-0.2 µM
Matryca RNA	zmienna	1 pg-500 ng
Enzyme Mix	1 µl	1 µl na reakcję
RNase-free Water	do 25 µl	-
Objętość reakcji	25 µl	-

## Uwagi:

1. Podczas przygotowywania reakcji Enzyme Mix powinno trzymać się na lodzie. Dodatkowo należy ograniczyć ekspozycję na światło w trakcie przygotowywania reakcji z sondami, aby uniknąć utraty intensywności sygnału fluorescencyjnego. Zalecane jest ograniczenie cykli rozmrażania i zamrażania 4 x Buffer Mix.
2. Po rozmrożeniu 4 x Buffer Mix, roztwór należy delikatnie wymieszać przed użyciem poprzez pipetowanie.
3. W przypadku większości cyklerów należy stosować objętość reakcji 25 µl. Inne objętości reakcji mogą być użyte, jeśli są zalecane przez producenta dla konkretnego cyklera.
4. Optymalna długość amplikonu w reakcji RT-qPCR z użyciem sond wynosi 70-150 pz.
5. Aby uniknąć amplifikacji genomowego DNA startery należy zaprojektować do sekwencji z eksonów (ang. exon-exon primers).
6. Reakcję RT-qPCR powinno przygotowywać się na lodzie w celu ograniczenia degradacji matrycy RNA.
7. Matrycę RNA (≤500 ng/reakcję) należy dodać do poszczególnych probówek PCR lub dołków w płytce, zawierających całą mieszaninę reakcyjną. Przed umieszczeniem w cyklerze należy całość krótko zwirować, aby pozbyć się pęcherzyków powietrza. Jeżeli pozostały jeszcze pęcherzyki zaleca się powtórzenie wirowania.
8. Temperatura zalecana dla reakcji odwrotnej transkrypcji to 50°C. Dla niektórych reakcji, w szczególnych przypadkach temperatura może zostać zmieniona.
9. Standardowe stężenie MgCl<sub>2</sub> w reakcji RT-qPCR wynosi 4 mM (stężenie końcowe uzyskane w reakcji po zastosowaniu 4x Buffer Mix), w większości przypadków to stężenie daje optymalne wyniki. Jednakże, jeśli wymagane jest wyższe stężenie MgCl<sub>2</sub>, należy przygotować MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 25 mM i dodać do reakcji.
10. Stężenie startera na poziomie 0.4 µM jest zazwyczaj optymalne, ale można je indywidualnie zmieniać w zakresie od 0.1 µM do 1 µM. Zalecane stężenie początkowe to 0.4 µM. Zwiększenie stężenia starterów może zwiększyć wydajność PCR, ale negatywnie wpłynąć na specyficzność RT-PCR. Optymalne stężenie startera zależy od indywidualnej reakcji i zastosowanego cyklera PCR.
11. Optymalna temperatura topnienia (T<sub>m</sub>) dla starterów powinna wynosić około 60°C. T<sub>m</sub> podwójnie znakowanych sond powinno być o 8-10°C wyższe niż T<sub>m</sub> starterów.
12. Dla każdego przebiegu reakcji w cyklerze należy ustawić wartość progową analizy (ang. threshold value).
13. Należy unikać G na końcu 5' podwójnie znakowanej sondy, ponieważ skutkuje to wygaszaniem sygnału fluorescencyjnego.

**Rekomendowany program:**

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Ilość cykli</b>
Odwrotna transkrypcja	50°C	15 min	1
Początkowa denaturacja	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	40-45
Annealing/Extension/ pomiar fluorescencji	60°C	40-60 s	
Chłodzenie	4°C	Nieokreślony	1

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039  
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23