

Обратная транскрипция (ОТ) (синтез первой цепи кДНК) и обратная транскрипция совмещенная с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР)

В основе наборов нашей фирмы для обратной транскрипции мы используем рекомбинантную обратную транскриптазу являющейся продуктом гена *pol* вируса лейкоза мышей Молони (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV). Обратная транскриптаза MMLV является РНК-зависимой ДНК полимеразой, обладающая как РНК-, так и ДНК-полимеразной активностью, и может быть использована для синтеза комплиментарной цепи ДНК (кДНК) длиной свыше 5 т.п.н.. В отличие от обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц (AMV) у обратной транскриптазы MMLV РНКазная Н активность (RNase H activity) значительно ниже.

РНКазная Н активность – активность проявляется в специфической деградации РНК в РНК:кДНК гибридах. Эта активность может не иметь особого значения, если скорость синтеза комплиментарной цепи ДНК значительно превышает скорость деградации РНК.

В качестве двухвалентного иона, необходимого для реализации активности обратной транскриптазы MMLV требуется Mg^{2+} . Температурный оптимум работы – +37 °С.

Для проведения реакции обратной транскрипции мы предлагаем следующие наборы:

Название набора	Особенности набора
Синтез первой цепи кДНК (базовый)	В состав набора не входят праймеры. Предполагается использование специфических праймеров заказчика.
Синтез первой цепи кДНК (рендом)	В состав набора входят случайные 6-мерные праймеры (hexa random).
Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ) ₁₅)	В состав набора входят 15-мерные олиго(дТ) праймеры.
ОТ-ПЦР (снят с производства)	Набор рассчитан на двухэтапный процесс: ОТ в первой пробирке, затем ПЦР – во второй. В состав набора входит набор по синтезу первой цепи кДНК и ПЦР набор на основе ColoredTaq полимеразы.

Выделение РНК

Для выделения РНК Вы можете воспользоваться любым методом, приводимым в многочисленных пособиях, лишь бы полученная вами РНК не была деградирована РНКазой. В случае, если выделение РНК является для вас дебютом, воспользуйтесь стандартным набором. Ваши шансы выделить нормальную РНК с первого раза при этом увеличиваются.

Для выделения РНК мы рекомендуем наборы, которые можно приобрести в нашей фирме:

Чтобы эффективность вашей работы была выше, обратите внимание на следующие моменты:

- старайтесь максимально уменьшить вероятность попадания РНКаз в реактивы, которыми вы пользуетесь для выделения РНК. Растворы для выделения должны готовиться на воде, проверенной на отсутствие РНКаз.
- при выделении РНК применяйте, если есть возможность, препараты, которые оказывают ингибирующее действие на РНКазы: β-меркаптоэтанол, ДТТ, РНазин.

- для реакции синтеза первой цепи кДНК в качестве матрицы лучше использовать очищенную мРНК, чем тотальную РНК. Использование для синтеза первой цепи поли(А)мРНК в значительной степени повышает чувствительность выявления редких мРНК, так как содержание мРНК в тотальной РНК достаточно мало (обычно, 0.1-5% от тотальной РНК эукариотических клеток).
- если есть возможность, проверьте перед началом работы качество выделенной вами РНК на электрофорезе. РНК должна идти в виде размазанного шмера в диапазоне от 300 оснований до 8 т.п.н.. Основная плотность мРНК, как правило, наблюдается в диапазоне от 1 до 2 т.п.н..

Содержание мРНК может сильно варьировать в зависимости от материала. Например, 100 мг клеток печени крысы содержат прибл. 15 мкг мРНК, а 10^7 клеток HeLa - прибл. 3 мкг мРНК. Немаловажную, если не решающую роль, играет качество материала. Чем свежее материал, тем больше шансов получить много чистой РНК. Для сохранения РНК в образце можно использовать следующие способы:

- заморозить образец в жидком азоте и хранить при температуре не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- как можно быстрее обработать образец лизирующим буфером.

(Фирма **Clonogene** (Санкт-Петербург), предлагает реагент под названием **EverFresh**, который инактивирует РНКазы и позволяет сохранять материал даже при комнатной температуре в течении длительного времени).

Предупреждение возможности загрязнения рибонуклеазами (РНКазами)

Помните, что успешное выделение РНК зависит от чистоты используемых материалов. Если все в работе готово заранее, то это не будет вызывать задержек в работе и уменьшит возможность загрязнения РНКазами.

Основными источниками РНКаз являются **руки**, а также **бактерии** и **грибы**, которые могут распространяться с пылью. Чтобы избежать загрязнений, достаточно стандартной микробиологической техники работы. Работайте в перчатках и открывайте используемые реактивы на минимальное время. Для работы с РНК лучше применять одноразовый пластик. Он, как правило, не содержит РНКаз и не требует предварительной анти-РНКазной обработки, но для надежности его можно дополнительно проавтоклавировать.

Если приходится работать с многократно используемым стеклом и пластиком, то эти материалы необходимо перед работой обрабатывать. Стекло рекомендуется "прожаривать" при $+200\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении ночи, а пластик промыть раствором 0.1 М NaOH с 1 мМ ЭДТА, затем водой, свободной от РНКаз и также проавтоклавировать при температуре, которую выдерживает данный пластик.

Применяемые растворы желательно обработать 0.05% диэтил пирокарбонатом в течении ночи при комнатной температуре и затем проавтоклавировать 30 мин для удаления следов диэтил пирокарбоната (следовые количества этого реактива могут сильно ингибировать работу многих ферментов, поэтому, если есть возможность, не используйте диэтил пирокарбонат).

Многие системы очистки воды, такие как **MilliQ**, производят воду, свободную от РНКаз, но в любом случае, старайтесь предварительно убедиться, что РНКазы в воде отсутствуют.

Работа с материалом, источником РНК

Чтобы обеспечить успешное выделение РНК, необходимо правильно собрать и подготовить материал для выделения.

Свежий образец ткани нужно как можно быстрее обрабатывать **лизирующим буфером**, чтобы избежать деградацию РНК. Если образцов много и они не могут быть обработаны сразу, образцы нужно измельчить, заморозить в жидком азоте и хранить при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Измельчение проводите стерильным лезвием.

Непосредственная процедура выделения поли(А)⁺-РНК одинакова для образцов ткани и культур клеток.

Расчет концентрации и чистоты полученной РНК

Определить концентрацию и чистоту полученной мРНК можно с помощью спектрофотометра, специальных красителей, по конечным результатам ПЦР и при помощи электрофореза. Использование спектрофотометра и электрофореза относятся к тем случаям, когда количество выделяемой РНК достаточное для такого анализа. В настоящее время выделение РНК часто носит аналитический характер. В этом случае единственным методом является оценка по конечным результатам ПЦР.

Спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты рНК

Этот метод можно применять только в тех случаях, когда выделенное количество рНК достаточно для чувствительности этого метода.

Концентрацию мрНК определяют по адсорбции при длине волны 260 нм (A_{260}). A_{260} равное 1 соответствует 40 мкг мрНК. Для определения концентрации в полученном образце, возьмите часть образца, разведите до необходимого для измерения в кювете объема, измерьте A_{260} и рассчитайте концентрацию образца по следующей формуле:

$$A_{260} \times [\text{фактор разведения}] \times 40 \text{ мкг/мл} = [\text{ваш образец}] \text{ мкг/мл мрНК}$$

Чистоту образца определяют исходя из соотношения A_{260}/A_{280} . Если $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$, то препарат достаточно чист.

(Кювета должна быть свободна от рНКаз. Для этого перед внесением в кювету образца, ополосните кювету раствором 50 мМ NaOH, а затем стерильной водой)

Почти во всех способах выделения мрНК, полученный препарат обычно содержит небольшие примеси рибосомальной рНК. Примеси этой рНК следует учитывать, когда идет расчет количества полученной мрНК. Чтобы оценить количество этих примесей, в случаях, когда количество полученного материала это позволяет, мы рекомендуем провести денатурирующий электрофорез в агарозном геле.

Определение концентрации и чистоты рНК в агарозном геле

Этот метод можно применять только в тех случаях, когда выделенное количество рНК достаточно для чувствительности этого метода.

Количество и качество рНК может быть быстро определено при помощи электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом. Для проведения электрофореза обработайте электрофоретическую ванну раствором 50 мМ NaOH, а затем ополосните стерильной водой, чтобы избавиться от рНКаз. Для проведения электрофореза рНК используйте отдельную электрофоретическую ванну, так как препараты ДНК содержат очень много рНКаз.

1. Приготовьте 1%-ый агарозный гель, используя стерильный TBE буфер. Добавьте в гель при его приготовлении этидиум бромид до концентрации 0.5 мкг/мл.
2. Смешайте образец (0.5-2 мкг рНК) с буфером для нанесения (10% сахарозы, 90% деионизованного формамида *(готовится путем обработки формамида хелатирующими смолами)*, 0.05% бромфенолового синего, 0.05% ксилен цианолового). Объем образца не должен быть больше 50% от объема буфера.
3. Прогрейте образец при 60-65 °С в течении 3 мин, охладите до комнатной температуры и наносите образец на гель.

мрНК выглядит как шмер от 8000 до 300 оснований. Регион с наибольшей интенсивностью расположен в районе припл. 2000 оснований. мрНК обычно содержит 10-25% примеси рибосомальной рНК (ррНК), видимой на геле в качестве полос в районе 2000 оснований (18s ррНК), 5000 оснований (28s ррНК) и иногда в районе 100 оснований (5s ррНК) *(примеси ррНК не влияют функционально на большинство областей применения мрНК)*. Полосы ррНК обычно не видны после второго раунда очистки.

Наборы

Синтез первой цепи кДНК

Наборы для синтеза первой цепи кДНК предназначены для получения полноразмерной первой цепи кДНК из матрицы РНК. Размер синтезируемой кДНК за счет низкой РНКазной активности у обратной транскриптазы MMLV может достигать 9 т.п.о..

Минимальное время получения полноразмерной кДНК – 30 мин.

Стандартное время получения полноразмерной кДНК – 1 час 30 мин.

Для получения первой цепи кДНК могут быть использованы различные праймеры. Каждый тип праймеров имеет свои особенности, которые желательно учитывать при планировании синтеза кДНК.

Специфические праймеры

Избирательно отжигаются на строго определенной последовательности РНК. Этот тип праймеров часто применяют для диагностических целей.

Случайные гексонуклеотиды (random)

Неспецифически связываются на матрице РНК, нарабатывая небольшие (короткие) перекрывающиеся кДНК практически по всей матрице РНК. Эти праймеры идеально подходят для преодоления сложных участков с вторичной структурой матрицы. Ими можно эффективно транскрибировать 5' район мРНК и изучать всю последовательность мРНК.

Олиго(дТ)₁₅

Синтез первой цепи идет с 3' конца поли(А)⁺ мРНК, часто прочитывается вся мРНК. Удобен для работы с 3' районом или с мРНК, длина которых не превышает 5 т.п.о..

Первая синтезированная цепь может затем быть использована для дальнейшего исследования в ПЦР, секвенировании или для гибридизации в Нозер (Northern) блоте.

Состав наборов рассчитан на 100 реакций

Название набора	Состав набора		Хранение
Синтез первой цепи кДНК (базовый)	М-MLV обратная транскриптаза	10'000 ед.	-20 °С
	х10-кратный буфер для фермента	300 мкл	
	2.5 mM смесь dNTP	400 мкл	
	Вода, свободная от РНКаз	2 мл	
Синтез первой цепи кДНК (рандом)	М-MLV обратная транскриптаза	10'000 ед.	-20 °С
	х10-кратный буфер для фермента	300 мкл	
	2.5 mM смесь dNTP	400 мкл	
	Гекса праймеры, 0.5 мкг/мл (15 опт.ед./мл)	100 мкл	
	Вода, свободная от РНКаз	2 мл	
Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ) ₁₅)	М-MLV обратная транскриптаза	10'000 ед.	-20 °С
	х10-кратный буфер для фермента	300 мкл	
	2.5 mM смесь dNTP	400 мкл	
	Олиго(дТ)₁₅ праймеры, 0.5 мкг/мл (15 опт.ед./мл)	100 мкл	
	Вода, свободная от РНКаз	2 мл	

Протокол проведения процедуры обратной транскрипции

В приводимом ниже протоколе мы предлагаем процедуру, которую считаем оптимальной. В соответствии со своими задачами вы можете модифицировать данную процедуру.

Как уже отмечалось выше, обратная транскрипция может проводиться с использованием различных праймеров. Используйте набор с олиго(дТ)₁₅ праймерами, если вы собираетесь исследовать 3' район РНК или хотите в дальнейшем клонировать кДНК. Набор со случайными гексапраймерами более универсален. Он пригоден для исследования РНК по всей длине и в особенности 5' района РНК.

1. В пробирке, помещенной в лед, смешайте следующие компоненты:

• РНК матрица	<u>2 мкл</u>
тотальная РНК	0.1 - 5 мкг
или поли(А) ⁺ РНК	10 - 0.5 нг
или специфическая РНК	0.01 пг и меньше
• праймер	<u>1 мкл</u>
специфический	15 - 20 пмолей
или случайный гексапраймер	0.5 мкг (1мкл)
или олиго(дТ) ₁₅	0.5 мкг (1мкл)
• вода, свободная от РНКаз	<u>до 18 мкл</u>

Перемешайте, осадите капли кратковременным центрифугированием.

2. Инкубируйте смесь 5 мин при +70 °С, перенесите пробирку в лед и соберите капли кратковременным центрифугированием.

3. Поместите пробирку в лед и добавьте следующие компоненты:

• x10-кратный ОТ буфер	<u>2.5 мкл</u>
• 2.5 mM смесь dNTP	<u>4 мкл</u>
• MMLV обратная транскриптаза	<u>0.5 мкл</u>

4. Инкубируйте смесь в течении 60 мин при +37 °С (при использовании случайных гексапраймеров перед инкубацией при +37 °С проинкубируйте смесь в течении 10 мин при +25 °С и затем инкубируйте смесь в течении 60 мин при +37 °С).

5. Остановите реакцию прогреванием смеси в течении 10 мин при +70 °С. Перенесите смесь в лед. Полученная кДНК может быть непосредственно сразу же использована для ПЦР или синтеза второй цепи и последующего клонирования.

Храните синтезированную кДНК при -20 °С или при -70 °С для долгосрочного хранения.

Примечания

- использование поли(А)⁺ РНК вместо тотальной РНК позволяет существенно повысить специфичность и эффективность синтеза кДНК.
- в отличие от использования олиго(дТ)₁₅ праймеров, которые, как правило, не требуют оптимизации, от соотношения случайных гексапраймеров по отношению к РНК зависит длина синтезируемой кДНК. Увеличение концентрации гексапраймеров по отношению к РНК будет приводить к преимущественному синтезу коротких (около 600 нуклеотидов) кДНК, и наоборот, уменьшение концентрации гексапраймеров по отношению к РНК будет способствовать синтезу более длинных кДНК.
- проблемы, обусловленные наличием вторичной структуры в GC богатых молекулах РНК можно попробовать обойти повышением температуры реакции до +45 °С или добавлением в реакционную смесь ДМСО. Правда, эти изменения могут привести к уменьшению выхода кДНК.

Наборы

Обратная транскрипция совмещенная с полимеразной цепной реакцией (ОТ ПЦР)

(данные наборы сняты с производства, приводимая ниже информация дается исключительно в ознакомительных целях)

ОТ ПЦР может проводиться в нескольких вариантах: **А - две пробирки, два этапа** (в одной пробирке ОТ, затем в другой ПЦР), **В - одна пробирка, два этапа** (в одной и той же пробирке ОТ и затем ПЦР), **С - одна пробирка, один этап** (в одной и той же пробирке ОТ, совмещенная с последующей ПЦР).

А. Две пробирки, два этапа

В первой пробирке осуществляется синтез кДНК при наиболее оптимальных условиях с использованием любых праймеров. Аликвота из пробирки с ОТ переносится в другую пробирку с термостабильной ДНК полимеразой, соответствующим буфером и ПЦР праймерами, где проводится ПЦР.

Преимущество такого подхода – полученную в ОТ кДНК можно использовать для разных целей и в нескольких повторах и вариантах. Можно подобрать наиболее оптимальные условия (концентрация Mg^{2+} , dNTP, праймеров, фермента) как для ОТ, так и для ПЦР, что, в конечном итоге даст наибольший выход и специфичность.

В. Одна пробирка, два этапа

В одной и той же пробирке осуществляется ОТ с использованием любых праймеров и затем в эту же пробирку добавляется оптимальная для ПЦР смесь с термостабильной ДНК полимеразой, соответствующим буфером, ПЦР праймерами и проводится ПЦР.

Преимущество такого подхода – когда концентрация РНК матрицы очень мала и вся наработанная в ходе ОТ кДНК идет в ПЦР.

С. Одна пробирка, один этап

Синтез кДНК и ПЦР проходят в одной и той же пробирке с одним и тем же буфером и одними и теми же специфическими праймерами. Нет необходимости открывать пробирку между ОТ и ПЦР и доносить в пробирку дополнительные компоненты.

Преимущество такого подхода – высокая чувствительность, как и в варианте В, но при этом риск контаминации значительно ниже, поскольку пробирка в ходе процесса не открывается.

Преимущество ОТ ПЦР в один этап	Преимущество ОТ ПЦР в два этапа
Экономия времени Экономится время за счет смешивания компонентов	Возможность оптимизации условий реакции Можно максимально оптимизировать по отдельности ОТ и ПЦР
Уменьшается риск контаминации Поскольку материал не переносится из пробирки в пробирку, риск контаминации существенно снижается	Широкий выбор действий Одну и ту же полученную кДНК можно использовать не только для ПЦР, но и для других молекулярно-генетических приложений
Повышается чувствительность синтеза кДНК Т.к. вся кДНК используется для ПЦР, чувствительность метода повышается	Получение длинных продуктов Комбинируя ОТ с ПЦР с применением термостабильных полимераз с различными свойствами, в результате ОТ ПЦР можно получать очень длинные последовательности (длиннее 10 т.п.о.)

Итак, если вам нужен эффективный ОТ ПЦР, остановите ваш выбор на двухэтапном варианте. Если вас привлекает быстрый и аналитический ОТ ПЦР – выбирайте одноэтапный вариант.

Набор

ОТ-ПЦР (базовый, гексануклеотидный (random), олиго (дТ)₁₅)

(данные наборы сняты с производства, приводимая ниже информация дается исключительно в ознакомительных целях)

Набор рассчитан на проведение ОТ ПЦР по любому описанному выше варианту.

Как основной рекомендуемый вариант, мы предлагаем использовать этот набор для варианта А - **две пробирки, два этапа.**

Если вы хотите использовать набор для других вариантов, самостоятельно внесите коррективы в предлагаемый протокол постановки ОТ ПЦР.

В состав набора входит один из наборов **Синтез первой цепи кДНК** и набор ПЦР с термостабильной полимеразой. По умолчанию, базовый ПЦР набор комплектуется **ColoredTaq** полимеразой (2.5 ед./мкл) и х10-кратным буфером с pH 8.6, 25 mM Mg²⁺. При комплектовании другими полимеразой стоимость набора может отличаться от базовой.

Состав наборов рассчитан на 100 реакций

Название набора	Состав набора		Хранение
ОТ-ПЦР (базовый, гексануклеотидный (random), олиго (дТ) ₁₅)	М-MLV обратная транскриптаза	10'000 ед.	-20 °С
	х10-кратный буфер для фермента	300 мкл	
	2.5 mM смесь dNTP	800 мкл	
	Без праймеров или		
	Гекса праймеры или		
	Олиго(дТ)₁₅ праймеры,		
	0.5 мкг/мл (15 опт.ед./мл)	100 мкл	
	Вода, свободная от РНКаз	4 мл	
	ColoredTaq (2.5 ед./мкл)	250 ед.	
	х10-кратный буфер для полимеразы	500 мкл	
Минеральное масло	2 мл		
Краска для нанесения на гель	200 мкл		

I. Протокол проведения процедуры обратной транскрипции

(В приводимом ниже протоколе мы предлагаем процедуру, которую считаем оптимальной. В соответствии со своими задачами вы можете модифицировать данную процедуру.)

Как уже отмечалось выше, обратная транскрипция может проводится с использованием различных праймеров. Используйте набор с олиго(dT)₁₅ праймерами, если вы собираетесь исследовать 3' район РНК или хотите в дальнейшем клонировать кДНК. Набор со случайными гексапраймерами более универсален. Он пригоден для исследования РНК по всей длине и в особенности 5' района РНК.

1. В пробирке, помещенной в лед, смешайте следующие компоненты:

- РНК матрица 2 мкл
 - тотальная РНК 0.1 - 5 мкг
 - или поли(А)⁺ РНК 10 - 0.5 нг
 - или специфическая РНК 0.01 пг и меньше

- праймер 1 мкл
 - специфический 15 - 20 пмолей
 - или случайный гексапраймер 0.5 мкг (1мкл)
 - или олиго(dT)₁₅ 0.5 мкг (1мкл)

- вода, свободная от РНКаз до 18 мкл

Перемешайте, осадите капли кратковременным центрифугированием.

2. Инкубируйте смесь 5 мин при +70 °С, перенесите пробирку в лед и соберите капли кратковременным центрифугированием.

3. Поместите пробирку в лед и добавьте следующие компоненты:

- x10-кратный ОТ буфер 2.5 мкл
- 2.5 mM смесь dNTP 4 мкл
- MMLV обратная транскриптаза 0.5 мкл

4. Инкубируйте смесь в течении 60 мин при +37 °С (при использовании случайных гексапраймеров перед инкубацией при +37 °С проинкубируйте смесь в течении 10 мин при +25 °С и затем инкубируйте смесь в течении 60 мин при +37 °С).

5. Остановите реакцию прогреванием смеси в течении 10 мин при +70 °С. Перенесите смесь в лед. Полученная кДНК может быть непосредственно сразу же использована для ПЦР или синтеза второй цепи и последующего клонирования.

Храните синтезированную кДНК при -20 °С или при -70 °С для долгосрочного хранения.

Примечания

- использование поли(А)⁺ РНК вместо тотальной РНК позволяет существенно повысить специфичность и эффективность синтеза кДНК.
- в отличие от использования олиго(dT)₁₅ праймеров, которые, как правило, не требуют оптимизации, от соотношения случайных гексапраймеров по отношению к РНК зависит длина синтезируемой кДНК. Увеличение концентрации гексапраймеров по отношению к РНК будет приводить к преимущественному синтезу коротких (около 600 нуклеотидов) кДНК, и наоборот, уменьшение концентрации гексапраймеров по отношению к РНК будет способствовать синтезу более длинных кДНК.
- проблемы, обусловленные наличием вторичной структуры в GC богатых молекулах РНК можно попробовать обойти повышением температуры реакции до +45 °С или добавлением в реакционную смесь ДМСО. Правда, эти изменения могут привести к уменьшению выхода кДНК.

II. Протокол проведения процедуры полимеразной цепной реакции

(В приводимом ниже протоколе мы предлагаем процедуру, которую считаем оптимальной. В соответствии со своими задачами вы можете модифицировать данную процедуру.)

1. В пробирке для проведения ПЦР смешайте следующие компоненты:

- х10-кратный Taq буфер 2.5 мкл
- 2.5 mM смесь dNTP 2 мкл
- ColoredTaq полимеразы 0.5 мкл
- кДНК матрица 2 мкл
- праймер 1 (50 пмолей) 1 мкл
- праймер 2 (50 пмолей) 1 мкл
- вода, свободная от RNКаз до 25 мкл

Перемешайте, осадите капли кратковременным центрифугированием.

При отсутствии у амплификатора нагревающей крышки, препятствующей испарению реакционной смеси в ходе реакции, добавьте к смеси минеральное масло, так, чтобы поверхность смеси была бы полностью закрыта и испарение смеси было бы невозможно.

2. Поместите пробирку в амплификатор и установите параметры цикла, оптимальные, для получения желаемого результата.

Полученный в ходе амплификации продукт (если амплификация проводилась с ColoredTaq полимеразой) может сразу из пробирки наноситься на гель для анализа и не требует предварительного смешивания с краской. Обычно для анализа следует брать 5-10 мкл реакционной смеси.

Храните амплификат при **-20 °C** или при **-70 °C** для долгосрочного хранения.

Полученный амплификат может быть использован для второго раунда ПЦР (ПЦР с внутренними праймерами – nested PCR). В этом случае повторите ПЦР, смешивая компоненты в соответствии с рекомендациями п.1 этого раздела, но вместо кДНК матрицы внесите 2 мкл смеси из пробирки с первым раундом ПЦР.

✓ **Помните**, что ПЦР в два раунда имеет очень высокий риск контаминации. Поэтому при постановке ПЦР в два раунда используйте для переноса образца наконечники с антиаэрозольным вкладышем (в самом простом варианте можно поместить в наконечник маленький ватный тампон). Не держите поблизости от открываемых пробирок с результатами ПЦР реактивы, которые используются для выделения нуклеиновых кислот и постановки ПЦР, пластик, пипетки и т.д и т.п.. Всегда используйте отрицательные контроли. При малейшем признаке контаминации откажитесь от использования **всех** компонентов рабочей системы (буфера, праймеры, ферменты, минеральное масло, пипетки, даже рабочее место).