

Instrukcja

TranScriba™ noGenome™ Kit

Zestaw do syntezy pierwszej nici cDNA połączonej z efektywnym usuwaniem genomowego DNA.
Zawiera inhibitor RNAz i standardowe startery.

numer katalogowy	wielkość
4000NG-20	20 reakcji w 20 µl
4000NG-100	100 reakcji w 20 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzi w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis Treści

Opis	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Uwagi	4
Przed rozpoczęciem pracy	4
mieszanina noGenome™ (mieszanina reakcyjna usuwająca genomowe DNA)	5
Mieszanina TranScriba™ (mieszanina reakcyjna do syntezy cDNA)	5
Protokół	6

Opis

TranScriba™ noGenome™ Kit jest kompletnym zestawem odczynników przeznaczonym do odwrotnej transkrypcji w połączeniu z usuwaniem genomowego DNA. Składa się z dwóch następujących po sobie etapów: skutecznego pozbycia się genomowego DNA i wysokowydajnej syntezy pierwszej nici cDNA.

Na wstępie próbka RNA jest inkubowana w noGenome™ buforze w celu usunięcia genomowego DNA. Po wyeliminowaniu genomowego DNA próbka czystego RNA jest gotowa do odwrotnej transkrypcji. Odwrotna transkrypcja zajmuje od 15 do 60 minut w zależności od cech docelowego RNA i jakości matrycy.

TranScriba™ odwrotna transkryptaza ma wysokie powinowactwo do RNA i jest zmodyfikowana pod kątem wydajnej syntezy cDNA w szerokim zakresie RNA od 10 pg do 1 µg. Wysokie powinowactwo enzymu TranScriba™ w połączeniu z termostabilnością i buforem reakcyjnym, umożliwia wysoką wydajność syntezy cDNA, nawet z matryc o wysokiej zawartości GC lub ze złożonymi strukturami drugorzędowymi.

Skład

	20 reakcji	100 reakcji	przechowywanie
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	100 µl	500 µl	-20 °C
5x bufor reakcyjny	100 µl	500 µl	-20 °C
noGenome™ bufor	100 µl	300 µl	-20 °C
inhibitor RNAz	20 µl	60 µl	-20 °C
dNTP's mix	50 µl	250 µl	-20 °C
starter oligo(dT) ₁₈	30 µl	125 µl	-20 °C
starter dN-heksamer	30 µl	125 µl	-20 °C
woda jałowa	2 x 1,5 ml	4 x 1,5 ml	-20 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Probówki do PCR
- Lód
- Worteks
- Łażnia wodna lub blok grzejny
- Mikrowirówka
- Termocykler

Uwagi

- Używaj tylko plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od RNAz.
- Pracuj sterylnie, używając rękawiczek jednorazowych i fartucha laboratoryjnego.
- Nastawiaj wszystkie reakcje na lodzie, aby zminimalizować ryzyko degradacji RNA.
- Jeśli po rozmrożeniu, w 5x buforze reakcyjnym lub buforze noGenome™ widoczny jest osad, należy rozpuścić go przez worteksowanie. Jeśli jest to konieczne, należy inkubować bufor przez kilka minut w temp. 37 °C aż do momentu zniknięcia osadu.
- Siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na jakość produktu.

Przed rozpoczęciem pracy

Rozmrozić składniki w temperaturze pokojowej:

- matrycowe RNA
- odpowiednie startery
- bufor noGenome™
- TranScriba™ odwrotna transkryptaza
- 5x bufor reakcyjny
- dNTP's mix
- inhibitor RNAz
- woda jałowa

Każdy składnik wymieszać poprzez kilkakrotne odwracanie próbówki, krótko zwirować i umieścić w lodzie.

Przygotowanie mieszanin

- Przygotować objętości mieszanin o 10% większe niż wymagane dla całkowitej liczby reakcji do wykonania.
- Mieszaniny należy przygotować bezpośrednio przed przeprowadzeniem reakcji. Nie należy ich przechowywać.

mieszanina noGenome™

(mieszanina reakcyjna usuwająca genomowe DNA)

1. Przygotować mieszaninę noGenome™ według poniższej tabeli:

składnik	ilość na reakcję
noGenome™ bufor	2 µl
woda jałowa	8 µl

2. Wymieszać i rozporcjować po 10 µl do probówek do PCR. Probówki umieścić w lodzie.

Mieszanina TranScriba™

(mieszanina reakcyjna do syntezy cDNA)

1. Przygotować mieszaninę TranScriba™ według poniższej tabeli:

składnik		ilość na reakcję
5x bufor reakcyjny		4 µl
inhibitor RNAz		0,5 µl
dNTP's mix		2 µl
starter	oligo (dT) ₁₈	1 µl
	lub	
	dN-hexamer	1 µl
	lub	
	swoisty dla genu	15-25 pmol
TranScriba™ odwrotna transkryptaza		4 µl
woda jałowa		uzupełnić do 13 µl

2. Wymieszać i rozporcjować po 13 µl do probówek do PCR. Probówki umieścić w lodzie.

Protokół

1. Dodać po **4 µl matrycy RNA** do przygotowanych probówek z **mieszaniną noGenome™**.

Uwaga. Protokół jest przygotowany dla 10 pg do 1 µg RNA. Chodzi o całkowitą ilość RNA, uwzględniając rRNA, mRNA, wirusowe RNA i nośnikowe RNA. Jeśli używasz >1 µg RNA, zwiększ skalę reakcji liniowo.

2. Inkubować przez **2 min** w temp. **42 °C**, a następnie umieścić w lodzie.

Uwaga. Nie inkubować dłużej niż 10 min

3. Dodać po **7 µl mieszaniny noGenome™ z matrycowym RNA** do probówek z **mieszaniną TranScriba™**. Wymieszać przez pipetowanie. Zamknąć probówki i krótko zwirować.

Uwaga. Sugerujemy dodanie pozostałych 7 µl mieszaniny noGenome™ z matrycowym RNA do kontroli negatywnej reakcji bez TranScriba™ odwrotnej transkryptazy. Będzie to stanowiło kontrolę wydajności reakcji usuwania genomowego DNA w reakcji PCR.

4. Probówki z gotowymi mieszaninami reakcyjnym przenieść do urządzenia do PCR i uruchomić odpowiedni program, wprowadzony wcześniej według wskazówek poniżej oraz w punkcie 5. protokołu.

rodzaj startera	temperatura	czas
oligo (dT) ₁₈	42 °C	15-60 min
specyficzny dla genu	42 °C	15-60 min
losowy dN-hexamer	25 °C	5 min
	42 °C	następnie 15-60 min

Uwaga. Optymalny czas odwrotnej transkrypcji zależy od konkretnego produktu cDNA.

5. Zakończyć reakcję poprzez inkubację przez **5 min** w temp. **70 °C**.

Uzyskana pierwsza nić cDNA może zostać użyta w reakcji PCR lub przechowywana w temp. -20 °C do czasu dalszych analiz.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

