

Instrukcja

TranScriba™ Kit

Zestaw do syntezy pierwszej nici cDNA. Zawiera inhibitor RNAz i standardowe startery.

numer katalogowy	wielkość
4000-20	20 reakcji w 20 µl
4000-100	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 wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Opis

TranScriba™ Kit jest kompletnym zestawem odczynników, przeznaczonym do syntezy pierwszej nici cDNA na matrycy mRNA lub próbek całkowitego RNA.

W zestawie używana jest rekombinowana odwrotna transkryptaza MMLV z niską aktywnością RNAzy H oraz optymalną aktywnością polimerazy DNA w temp. 37-42 °C. Matrycowe RNA chronione jest rekombinowanym inhibitorem RNAz. Zestaw zawiera również startery oligo(dT)₁₈ i heksamery o losowej sekwencji. Zestaw umożliwia stosowanie starterów genowo-swoistych do inicjacji syntezy cDNA.

Skład

	4000-20	4000-100	przechowywanie
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	100 µl	500 µl	-20 °C
inhibitor RNAz	20 µl	60 µl	-20 °C
5x bufor reakcyjny	100 µl	500 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

Uwagi

- Przed użyciem składniki całkowicie rozmrozić i wymieszać.
- Używać plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od RNAz.
- Pracować sterylnie (jak przy pracy z RNA), używać jednorazowych rękawiczek i zmieniać je każdorazowo, kiedy wymaga tego dobra praktyka laboratoryjna.
- Siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność produktu.

Matrycowe RNA

Brak degradacji i czystość matrycy RNA są kluczowe do uzyskania pełnej długości cDNA. Całkowite RNA izolowane standardowymi metodami nadaje się do użycia z TranScriba Kit.

Aby uzyskać regularnie najlepsze wyniki zalecamy stosowanie zestawów do izolacji RNA typu Total RNA Mini (nr kat. 031-25, 031-100).

We wszystkich aplikacjach związanych z reakcją PCR, stosowane matrycowe RNA musi być wolne od DNA. W celu efektywnego i bezpiecznego usunięcia zanieczyszczeń DNA zalecamy przed reakcją odwrotnej transkrypcji zastosowanie zestawu Clean-Up (nr kat. 039-25C, 039-100C) lub Total RNA Zol-Out™ D (nr kat. 043-25, 043-100).

Zanieczyszczenie RNAzami

Wszystkie składniki zestawu są produkowane w sterylnych warunkach i rygorystycznie testowane na całkowity brak obecności RNAz. Dodatkowo w celu ochrony przed RNAzami, które mogłyby być wprowadzone podczas użycia zestawu, ma zastosowanie inhibitor RNAz. Przeciwdziała on całkowicie degradacji matrycowego RNA aż do stężenia 0,1 ng RNAzy na 1 µg mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji.

Typowy protokół syntezy pierwszej nici cDNA

1. Rozmrozić wszystkie składniki i wymieszać, a następnie krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2. Umieścić w lodzie sterylną probówkę wolną od RNAz i dodać kolejno:

składnik	ilość
matrycowe RNA	
całkowite RNA / mRNA	0,1-5 µg / 10 ng-0,5 µg
starter	
oligo(dT) ₁₈ lub dN-heksamer	1 µl
lub starter swoisty dla genu	15-25 pmol
woda jałowa	uzupełnić do 9,5 µl

3. Zamknąć probówkę. Mieszaninę reakcyjną wymieszać i krótko zwirować. Inkubować przez 5 min w temp. 65 °C w celu denaturacji matrycowego RNA. Po tym czasie natychmiast schłodzić w lodzie, zwirować i ponownie umieścić w lodzie.
4. Otworzyć probówkę i dodać kolejno pozostałe składniki:

składnik	ilość
5x bufor reakcyjny	4 µl
inhibitor RNAz	0,5 µl
dNTP's mix	2 µl
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	4 µl

5. Zamknąć probówkę. Mieszaninę reakcyjną delikatnie wymieszać i krótko zwirować.
6. Mieszaninę inkubować w zależności od zastosowanego startera:
 - **oligo(dT)₁₈** lub starter **genowo-swoisty**: 30-60 min w temp. 42 °C
 - **dN-heksamer**: 5 min w temp. 25 °C, następnie 60 min w temp. 42 °C
7. Zakończyć reakcję podgrzewając mieszaninę przez 5 min w temp. 70 °C. Uzyskana pierwsza nić cDNA może zostać użyta w reakcji PCR lub przechowywana w temp. od -20 do -70 °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

