



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## Instrukcja

# TranScriba™ 1step PCR Mix Probe

Zestaw do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi.

numer katalogowy	wielkość
2008-100Q	100 reakcji w 25 µl
2008-200Q	200 reakcji w 25 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



# Opis

**TranScriba™ 1step PCR Mix Probe** jest gotową mieszaniną do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. TranScriba™ odwrotna transkryptaza jest oparta na MMLV odwrotnej transkryptazie opracowanej dla reakcji qPCR. TranScriba™ odwrotna transkryptaza osiąga optymalną aktywność w temp. 50 °C podczas reakcji one-step qRT-PCR z zastosowaniem 1step PCR Mix Probe.

Mieszanina zawiera wszystkie składniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji, poza matrycą RNA, starterami i sondami.

Stosowanie gotowych mieszanin qPCR oszczędza czas i ogranicza niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki przez zmniejszenie ilości kroków pipetowania i wymaganych w reakcji qPCR.

Mieszanina jest zoptymalizowana pod kątem wydajnego i powtarzalnego one-step qRT-PCR.

# Skład

	2008-100Q	2008-200Q	przechowywanie
1step PCR Mix Probe	1 x 1,25 ml	2 x 1,25 ml	-20 °C
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	1 x 50 µl	1 x 100 µl	-20 °C
inhibitor RNAz	1 x 60 µl	1 x 60 µl	-20 °C
DTT	1 x 50 µl	1 x 50 µl	-20 °C
woda jałowa	1 x 1,5 ml	2 x 1,5 ml	-20 °C

# Skład mieszaniny 1step PCR Mix Probe

składnik

polimeraza DNA *Taq*

MgCl<sub>2</sub>

dNTPs

2x bufor reakcyjny

# Uwagi

- Przed użyciem całkowicie rozmrozić w lodzie, delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
- 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.
- Cykliczne, siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.

## Barwnik referencyjny ROX

Niektóre przyrządy do PCR wykonują korekcję sygnału fluorescencji i zaleca się stosowanie barwnika referencyjnego ROX do normalizacji sygnału. Należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta dotyczącymi dodawania barwnika referencyjnego ROX i jego stężenia.

## Przykładowy protokół przygotowania reakcji

1. Rozmrozić wszystkie składniki na lodzie, wymieszać, a następnie krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2. Umieścić sterylne probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji PCR		
	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	25 $\mu$ l
1step PCR Mix Probe	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
inhibitor RNAz	0,1 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
starter 1***	0,05 - 0,5 $\mu$ M*	0,1 - 1 $\mu$ M*	0,1 - 1 $\mu$ M*
starter 2***	0,05 - 0,5 $\mu$ M*	0,1 - 1 $\mu$ M*	0,1 - 1 $\mu$ M*
sonda***	0,06 $\mu$ M**	0,12 $\mu$ M**	0,15 $\mu$ M**
DTT	0,1 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	0,2 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
matryca RNA lub mRNA	0,1 pg - 100 ng RNA	0,1 pg - 100 ng RNA	0,1 pg - 100 ng RNA
	0,1 pg - 1 ng mRNA	0,1 pg - 1 ng mRNA	0,1 pg - 1 ng mRNA
woda jałowa	uzupełnić do 10 $\mu$ l	do 20 $\mu$ l	do 25 $\mu$ l

\* zalecane dla standardowego qPCR

\*\* ilość każdej sondy powinna zostać zoptymalizowana

\*\*\* końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej

3. Mieszaninę reakcyjną delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
4. Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program qRT-PCR.

**Uwaga.** Specyficzne warunki RT-PCR są zoptymalizowane dla każdej sondy/amplikonu. Trudne matryce (RNA bogate w pary GC czy RNA z drugorzędową strukturą) wymagają zazwyczaj dłuższych czasów denaturacji i wydłużania.

etap	temperatura	czas
odwrotna transkrypcja	50 °C	10 min
wstępna denaturacja	95 °C	3 min
40 cykli	95 °C	15 - 30 s
	58 - 70 °C*	15 - 60 s**

\* w zależności od temperatury przyłączania/wydłużania sond i starterów

\*\* w zależności od długości produktu PCR i/lub ilości amplikonów w probówce



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

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

