

Instrukcja

TranScriba™ 1step PCR Mix Sybr®

Zestaw do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z Sybr® Green.

numer katalogowy	wielkość
2008-100S	100 reakcji w 25 µl
2008-200S	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 wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Sybr® jest zarejestrowanym znakiem towarowym Molecular Probes Inc.

Opis

TranScriba™ 1step PCR Mix Sybr® jest gotową mieszaniną do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z Sybr® Green. 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 Sybr®.

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

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

	2008-1005	2008-2005	przechowywanie
1step PCR Mix Sybr®	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 Sybr

składnik

polimeraza DNA *Taq*

MgCl₂

dNTPs

2x bufor reakcyjny z Sybr® Green

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, ale może spowodować niewielki spadek fluorescencji.

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 μ l	20 μ l	25 μ l	
1step PCR Mix Sybr [®]	5 μ l	10 μ l	12,5 μ l	
inhibitor RNAz	0,1 μ l	0,2 μ l	0,25 μ l	
starter 1**	0,05 - 0,5 μ M*	0,1 - 1 μ M*	0,1 - 1 μ M*	
starter 2**	0,05 - 0,5 μ M*	0,1 - 1 μ M*	0,1 - 1 μ M*	
DTT	0,1 μ l	0,2 μ l	0,25 μ l	
TranScriba [™] odwrotna transkryptaza	0,2 μ l	0,4 μ l	0,5 μ 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 μ l	do 20 μ l	do 25 μ l

* zalecane dla standardowego qPCR

** 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 każdego 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 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

