syngen.pl kolumienki.pl

UniversalScript Reverse Transcriptase

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

UniversalScript Reverse Transcriptase	SY590511	SY590512
UniversalScript Reverse Transcriptase	50 ul	200 ul
5x Bufor UniversalScript	500 ul	2 ml
100 mM DTT	250 ul	1 ml

UniversalScript Reverse Transcriptase jest mało wrażliwa na warunki zewnętrzne, co umożliwia jej transport w temperaturze pokojowej. Standardowe przechowywanie przebiega w temperaturze -20°C.

Opis komponentów

UniversalScript Reverse Transcriptase zawiera modyfikowaną genetycznie odwrotną transkryptazę M-MLV, będącą wysoce aktywną polimerazą DNA zależną od RNA. Enzym syntetyzuje komplementarną nić cDNA na matrycy RNA, począwszy od specyficznego primera lub uniwersalnych primerów typu oligo-dT. 1 U enzymu katalizuje przyłączenie 1 nmola dTTP w czasie 10 minut w temperaturze 37°C. Brak aktywności RNazy H pozwala na uzyskanie pełnowymiarowego cDNA w dużej ilości. Enzym utrzymuje formę płynną w temperaturze -20°C dzięki buforowi do przechowywania zawierającemu 50% glicerol, Tris-HCl, NaCl, DTT, NP-40 i EDTA.

Bufor reakcyjny UniversalScript został tak skomponowany, aby zoptymalizować wydajność i specyficzność procesu odwrotnej transkrypcji. W skład buforu wchodzi między innymi $MgCl_2$ oraz DTT, w związku z czym w większości przypadków nie ma potrzeby dodawania ich osobno do reakcji. Jeśli zajdzie potrzeba wyeliminowania magnezu z miksu reakcyjnego lub zastąpienia go np. manganem, skontaktuj się biurem Syngenem.

Mastermiks

UWAGA: Nie należy sporządzać mastermiksu reakcyjnego. Składniki pojedynczej reakcji należy dodawać w kolejności podanej w procedurze.

Procedura

1. Wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić (o ile przechowywano je w -20°C), zworteksować i zwirować.
2. Do probówek reakcyjnych 0,2 ml dodać matrycowe RNA, primery i dNTP Mix

Do probówki 0,2 ml dodać:	Objętość	Stężenie w reakcji
Matrycowe RNA	-	do 5 ug
10 uM oligo-$dT_{(15-20)}$* LUB	5,5-15 ul	250-500 ng
10 uM primery specyficzne LUB	1,5-6 ul	50-200 ng
10 uM random heksamery	0,5-2 ul	50-200 ng
10 mM dNTP Mix	1-2,5 ul	0,2-0,5 mM
Woda do PCR	dopełnić do 15 ul	-
Objętość nie mniejsza niż	**15 ul**	

3. Zamknąć probówki, umieścić w termocyklerze i inkubować w temperaturze **70°C przez 5-10 minut**.
4. **Schłodzić** probówki
   - na lodzie 0°C,
     gdy użyto oligo-dT lub random heksametrów.
   - na stole przez 10-15 minut,
     gdy użyto primerów specyficznych
5. Zwirować i dodawać kolejno wodę, dNTP Mix, 5x Bufor reakcyjny UniversalScript, ewentualnie DTT i opcjonalny inhibitor RNaz.

Do probówki z kroku 4 dodawać kolejno:	Objętość	Stężenie w reakcji
Woda do PCR	dopełnić	-
5x Bufor UniversalScript	10 ul	1x
100 mM DTT	0-2,5 ul	5-10 mM
Inhibitor RNaz (opcjonalnie)	-	-
Objętość końcowa	**49 ul**	

6. Dodać 1 ul enzymu UniversalScript Reverse Transcriptase (200 U/ul) i delikatnie wymieszać pipetując objętość co najmniej 40 ul lub worteksując.

Do probówki z kroku 5 dodać:	Objętość	Stężenie w reakcji
UniversalScript Reverse Transcriptase 200U/ul	1 ul	200 U
Objętość końcowa	**50 ul**	

7. Inkubować w **37°C przez 30-90 minut**.

Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl