



SCRIPTUM First

Erst-Strang cDNA-Synthese für effiziente reverse Transkription

Datenblatt

Artikelnummer:

BS 48.020 20 Reaktionen x 20 µl

BS 48.100 100 Reaktionen x 20 µl

BS 48.500 500 Reaktionen x 20 µl

Chargen-Nummer:

Haltbarkeit:

Nur für Forschungszwecke

SCRIPTUM FIRST Reverse Transkriptase (roter Deckel)

200 units/µl

SCRIPTUM FIRST RT Puffer complete (grüner Deckel)

5x conc.

dNTP Mix (weißer Deckel)

10 mM pro dNTP

DTT Stammlösung (violetter Deckel)

100 mM DTT

Oligo-(dT)20 Primer (weißer Deckel)

100 µM

Random Hexamere (weißer Deckel)

100 µM

RNase Inhibitor (gelber Deckel)

40 units/µl

RNase-freies Wasser (weißer Deckel)

<p>Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg</p>	<p>E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de</p>	<p style="text-align: right;">Seite</p> <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p>
--	--	---



SCRIPTUM First

Erst-Strang cDNA-Synthese für effiziente reverse Transkription

Beschreibung:

Der SCRIPTUM FIRST cDNA Synthese Kit enthält alle Reagenzien, die für die Erst-Strang cDNA-Synthese benötigt werden und kombiniert einfache Handhabung mit hoher Flexibilität. Eine reverse Transkriptase in Premiumqualität, ultrareine dNTPs und ein optimierter Reaktionspuffer sichern überragende Ergebnisse mit höchster Reproduzierbarkeit. Der Kit ist auf hohe Effizienz für ein breites Spektrum an Primer-Template-Kombinationen optimiert.

Die SCRIPTUM FIRST Reverse Transkriptase ist eine rekombinant hergestellte Version der M-MLV Reverse Transkriptase (M-MLV RT), bei der die RNase H-Aktivität eliminiert und die thermische Stabilität verbessert wurde.

Das Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die, ausgehend von einem Primer, mit einzelsträngiger RNA oder DNA als Template einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Die verbesserte thermische Stabilität in Kombination mit der Deaktivierung der RNase H-Aktivität führt zu erhöhter Spezifität, einer größeren cDNA-Ausbeute und gesteigerter Effizienz bei Vollängen-cDNA-Synthese verglichen mit der Standard M-MLV RT. Das Enzym wird für die cDNA-Synthese von 100 bp bis zu einer Länge von 10 kb empfohlen.

Anwendung

Synthese von stark strukturierten und langen cDNA-Fragmenten, extrem sensitive und hochspezifische RT PCR, DNA labeling.

Qualitätskontrolle

Aufgereinigt frei von Endo- und Exodesoxyribonukleasen, Phosphatasen und Ribonuklease. Aktivität und Stabilität getestet in Erst-Strang cDNA-Synthese.

Empfohlene Protokolle für die cDNA-Synthese

Die Denaturierung der Proben wird besonders empfohlen für RNA Targets, die einen hohen Grad an Sekundärstrukturen aufweisen, für selbst- oder kreuz-hybridisierende Primer und für erste Experimente mit neuen Targets.

Für viele Standardkombinationen von RNA und Primern kann die Hitzebehandlung eventuell ohne negative Beeinflussung der Ergebnisse weggelassen werden.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Seite Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--

■ Protokoll ohne Probedenaturierung (Standard RNA/Primer Kombinationen)

□ Assay-Vorbereitung

Folgende Komponenten werden in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt. Alle Pipettierschritte werden auf Eis durchgeführt und die Komponenten werden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Generell sollten Wasser, RNA und Primer zusammen gemischt werden bevor die anderen Komponenten hinzugefügt werden.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	20 µl Ansatz
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 20 µl
RNA Template		Gesamt-RNA: 10 pg - 5 µg oder mRNA: 10 pg - 500 ng	x µl
Primer	100 µM	Gen-spezifische Primer: 10-20 pmol (50-100 ng) oligo-(dT) ₁₅₋₂₅ Primer: 50 pmol (300 ng) random Primer: 50 pmol (100 ng)	0.1 - 0.2 µl 0.5 µl 0.5 µl
SCRIPTUM FIRST RT Puffer complete	5x	1x	4 µl
dNTP Mix	10 mM pro dNTP	500 nM pro dNTP	1 µl
DTT Stammlösung 1)	100 mM	5 mM	1 µl
RNase Inhibitor 2)	40 units/µl	40 units	1 µl
SCRIPTUM FIRST Reverse Transkriptase 3)	200 units/µl	100 units	0.5 µl

- 1) Die Zugabe von bis zu 5 mM DTT kann die Ausbeute verbessern und wird zur individuellen Optimierung empfohlen.
- 2) Die Zugabe von 40 units RNase Inhibitor pro Ansatz wird empfohlen und kann essentiell sein wenn mit einer geringen RNA-Menge als Ausgangsmaterial gearbeitet wird.
- 3) 100 units (0.5 µl) Enzym wird für Standard-Assays empfohlen, aber die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge auf 200 units (1µl) pro Ansatz kann unter ausgewählten Konditionen zu einer höheren Transkriptions-Ausbeute führen.

Weiter bei Schritt 2 **Erst-Strang cDNA-Synthese**

Protokoll mit Probendenaturierung (RNA/Primer Kombinationen mit ausgeprägter Sekundärstrukturbildung)

- Vorbereitung des RNA/Template/Primer-Mix

Folgende Komponenten werden in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	20 µl Ansatz
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 10 µl
RNA Template		Gesamt-RNA: 10 pg - 5 µg oder mRNA: 10 pg - 500 ng	x µl
Primer	100 µM	Gen-spezifische Primer: 10-20 pmol (50-100 ng) oder	0.1- 0.2 µl
		oligo-(dT)15-25 Primer: 50 pmol (300 ng) oder	0.5 µl
		random Primer: 50 pmol (100 ng)	0.5 µl

- Denaturierung und Primer-Annealing

Der Ansatz wird für 5 min bei 65-70°C inkubiert und auf Raumtemperatur (bei Einsatz von spezifischen Primern) oder auf Eis (bei Einsatz von oligo-dT oder random Primern) gestellt.

- Vorbereitung des Reaktionsmix

Folgende Komponenten werden in ein weiteres Nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	20 µl Ansatz
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 10 µl
SCRIPTUM FIRST RT Puffer complete	5x	1x	4 µl
dNTP Mix	10 mM pro dNTP	500 nM pro dNTP	1 µl
DTT Stammlösung 1)	100 mM	5 mM	1 µl
RNase Inhibitor 2)	40 units/µl	40 units	1 µl
SCRIPTUM FIRST Reverse Transkriptase 3)	200 units/µl	100 units	0.5 µl

1) Die Zugabe von bis zu 5 mM DTT kann die Ausbeute verbessern und wird zur individuellen Optimierung empfohlen.

2) Die Zugabe von 40 units RNase Inhibitor pro Ansatz wird empfohlen und kann essentiell sein wenn mit einer geringen RNA-Menge als Ausgangsmaterial gearbeitet wird.

3) 100 units (0.5 µl) Enzym wird für Standard-Assays empfohlen, aber die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge auf 200 units (1µl) pro Ansatz kann unter ausgewählten Konditionen zu einer höheren Transkriptions-Ausbeute führen.

Vervollständigung des Reaktionsmix

Der 10 µl Reaktionsmix wird zu dem 10 µl RNA/Template/Primer Mix gegeben um den 20 µl Reaktionsmix zu komplettieren. Alle Pipettierschritte werden auf Eis durchgeführt und die Ansätze werden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

■ Erst-Strang cDNA-Synthese

Inkubation

Bei Einsatz von Gen-spezifischen Primern wird der Reaktionsmix 30-60 min bei 50°C inkubiert. Bei Verwendung von oligo-dT oder random-Primern wird der Reaktionsmix zuerst 10 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation von 30-60 min bei 50°C.

Bitte beachten: Die optimale Inkubationszeit hängt von der Länge der cDNA ab. Eine Inkubation von 60 min wird für cDNA-Fragmente länger als 2000 bp empfohlen. Die optimale Temperatur hängt von den strukturellen Eigenschaften der RNA ab. Für schwierige Templates mit ausgeprägter Sekundärstrukturbildung sollte die Temperatur auf 55°C erhöht werden. Es ist zu beachten, daß die optimale Reaktionszeit und Temperatur für jede einzelne RNA angepasst werden muß.

Die cDNA kann jetzt als Template für die PCR eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden. Für die weitere Amplifikation in einer PCR können bis zu 5 µl des RT-Ansatzes eingesetzt werden.

Für einige spezifische DNA – Anwendungen kann jedoch eine vorherige Inaktivierung der RTase oder die enzymatische Entfernung der RNA notwendig sein.

Optional: Hitzeinaktivierung

Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wird der Reaktionsmix 10 min auf 70°C erhitzt.

Optional: RNA-Entfernung

Zugabe von 2 Units DNase-freie RNase und Inkubation für 20 min bei 37°C.



SCRIPTUM First

Erst-Strang cDNA-Synthese für effiziente reverse Transkription

Lieferung: bei Raumtemperatur

Lagerung: bei -20°Celsius, häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden
Qualität garantiert für 12 Monate

Sicherheitshinweise und Vorkehrungen: Dieses Produkt und seine Komponenten sollten nur von Personen verwendet werden, die eine geeignete Ausbildung für die Arbeitstechniken in einem Forschungslabor haben. Es ist ratsam, geeignete Schutzkleidung wie Laboroveralls, Schutzbrillen und Handschuhe zu tragen. Es ist darauf zu achten, den Kontakt mit Haut oder Augen zu vermeiden. Im Falle des Kontakts sofort mit Wasser abspülen.

Bio&SELL Lohweg 27 90537 Feucht bei Nürnberg	E-Mail: info@bio-sell.de Internet: www.bio-sell.de	Seite Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32 Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33
---	--	--