



RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

Datenblatt

Artikel-Nr. BS 54.0040 40 Reaktionen x 25 µl
Artikel-Nr. BS 54.0200 200 Reaktionen x 25 µl
Artikel-Nr. BS 54.1000 1000 Reaktionen x 25 µl

(Nur für Forschung und *in vitro*-Anwendungen)

Chargen-Nr.:

Mindestens haltbar bis:

Aussehen: klare Flüssigkeit

Farbe: farblos

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



RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

Beschreibung

Der Bio&SELL RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (Rox) - Kit kombiniert die Reverse Transkription und die anschließende Real Time PCR in einem Tube. Alle benötigten Reagenzien für die Synthese qualitativ hochwertiger cDNA und die quantitative Real Time PCR sind enthalten (außer Template, Primer und Sonden).

Zusammensetzung

- **2x RT-QPCR Enzym Mix LP: (roter Deckel) ●**
Mix bestehend aus: Reverse Transkriptase, Hot Start Polymerase und RNase Inhibitor in Lagerungspuffer mit 50% Glycerol (v/v)
- **RNase-freies Wasser (weißer Deckel) ◐**

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



RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

Doppelt markierte (“dual labeled”) Fluoreszenz- Sonden

Die Real-Time-PCR Technologie basierend auf doppelt markierten Sonden bietet ein hoch sensitives und spezifisches PCR System mit Multiplex-Fähigkeit. Es benötigt zwei Standard-PCR-Primer und die DNA-Sonde, die an einem inneren Teil des Amplikons hybridisiert. Die Sequenz der doppelt markierte DNA-Sonde sollte möglichst keine Sekundärstruktur und keine Primer-Dimer-Bildung aufweisen.

ROX-Farbstoff

ROX ist ein passiver, interner Referenzfarbstoff, der zur Normalisierung des Fluoreszenz-Reportersignals während der QPCR verwendet wird.

Sensitivität

Im allgemeinen können Targets von <1 pg bis 20 ng Poly-(A) RNA (mRNA) oder 10 pg bis 100 ng Gesamt-RNA nachgewiesen werden. Auch geringere Mengen an RNA kann durch die Verwendung stark exprimierter Transkripte erfolgreich amplifiziert werden.

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

RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

RT-PCR Assay **ohne** Proben-Denaturierung (Standard RNA/ Primer Kombinationen)

Anmerkung: Eine Proben-Denaturierung ist besonders empfehlenswert für die RNA-Targets, die einen hohen Grad an Sekundärstruktur aufweisen, für Selbst- oder Kreuz komplementäre Primer und für erste Versuche mit neuen targets. Für viele Standardkombinationen von RNA und Primern kann die Wärmebehandlung ohne negative Auswirkungen auf die Ergebnisse entfallen.

Geben Sie die Komponenten in der folgenden Reihenfolge in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß.

Pipettieren Sie dabei **auf Eis** und mischen Sie die Komponenten durch vorsichtiges auf- und abpipettieren. Generell sollte immer zuerst das Wasser, die RNA und die Primer miteinander vermischt werden, bevor die restlichen Komponenten zugegeben werden.

Komponente	Stock Konz.	Endkonz.	20 µl Assay	25 µl Assay
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 20 µl	Auffüllen auf 25 µl
RNA Template ¹⁾		< 100 ng	X µl	X µl
forward Primer	10 µM	400 nM	0.8 µl	1 µl
reverse Primer	10 µM	400 nM	0.8 µl	1 µl
Markierte Sonde	10 µM	200 nM	0.4 µl	0.5 µl
2x RT-QPCR Enzym-Mix LP ²⁾	2x	1x	10 µl	12.5 µl

1) bis zu 100 ng polyA-RNA oder Gesamt-RNA

2) RT-QPCR Enzym Mix enthält bereits den RNase Inhibitor (dieser kann essentiell sein wenn mit geringen Mengen an RNA gearbeitet wird)

Fahren Sie fort mit dem “Reverse Transkription und PCR-Protokoll“ auf S. 6

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

RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

RT-PCR Assay **mit** Proben-Denaturierung
(RNA/ Primer mit einem hohen Grad an Sekundärstruktur)

1. Herstellung des RNA /Primer Mix

Anmerkung: Eine Proben-Denaturierung ist besonders empfehlenswert für die RNA-Targets, die einen hohen Grad an Sekundärstruktur aufweisen, für Selbst- oder Kreuzkomplementäre Primer und für erste Versuche mit neuen targets. Für viele Standardkombinationen von RNA und Primern kann die Wärmebehandlung ohne negative Auswirkungen auf die Ergebnisse entfallen.

Geben Sie die Komponenten in folgender Reihenfolge in ein Nuklease-freies Tube. Pipettieren Sie dabei **auf Eis** und mischen Sie die Komponenten durch vorsichtiges auf- und abpipettieren.

Komponente	Stock Konz.	Endkonz.	20 µl Assay	25 µl Assay
RNase-freies Wasser			Auffüllen auf 10 µl	Auffüllen auf 12,5 µl
RNA Template		< 100 ng	X µl	X µl
forward Primer	10 µM	400 nM	0.8 µl	1 µl
reverse Primer	10 µM	400 nM	0.8 µl	1 µl
Markierte Sonde	10 µM	200 nM	0,4 µl	0,5 µl

2. Denaturierung und Primer Annealing

Inkubation des Ansatzes

- für 5 min bei 70°C
- anschließend für 5 min bei Raumtemperatur

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

RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

3. Vervollständigung des RT-QPCR Mix

Zugabe von **10 µl** bzw. **12,5µl 2x RT-QPCR Enzym-Mix LP** zum **RNA / Primer Mix** um den **20 µl** bzw. **25µl Assay** zu vervollständigen.
Pipettieren Sie dabei **auf Eis** und mischen Sie die Komponenten durch vorsichtiges auf- und abpipettieren.

Reverse Transkription und PCR-Protokoll

Stellen Sie die Proben in einen PCR-Cycler und starten Sie folgendes Programm:

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription ³⁾	50°C	10-15 min	1x
Initiale Denaturierung ⁴⁾	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	15 sek	35-45x
Annealing ⁵⁾ und Elongation ⁶⁾	60-65 °C	1 min	

RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

- 3) Eine Reverse Transkriptions-Zeit von 10 min wird empfohlen bei Amplikon-Längen zwischen 100-200bp. Längere Amplikone bis zu 500bp benötigen eine verlängerte Inkubationszeit von 15 min. Fügen Sie weitere 3 min pro zusätzlichen 100bp hinzu. Die optimale Temperatur hängt von den Struktureigenschaften der RNA ab. Erhöhen Sie die Temperatur auf 55 °C bei schwierigen Templates mit starker Sekundärstruktur-Bildung. Bitte beachten Sie, dass die optimale Reaktionszeit und Temperatur für jede einzelne RNA angepasst werden sollte.
- 4) Eine Initiale Denaturierungszeit von 5min wird empfohlen um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren
- 5) Die Annealing-Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der Primer und der DNA Sonde ab.
- 6) Die Elongationszeit hängt von der Länge des Amplikons ab: 30 sek. für eine Amplikonlänge von bis zu 500 bp oder 1min für eine Amplikonlänge von bis zu 1.000bp ist dabei empfohlen.

Anmerkung:

Für eine optimale Spezifität und Amplifikation kann eine individuelle Optimierung der empfohlenen Parameter nötig sein. Bitte beachten Sie dass für jede einzelne RNA und jedes Primer-Paar eine Anpassung der optimalen Reaktionszeiten und Temperaturen vorgenommen werden sollte.

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



RevTrans QPCR One-Step Labeled Probes (ROX)

Technische Daten

Versand: bei Raumtemperatur

Lagerung: bei -20 °Celsius

Häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden!

Sicherheitshinweis: Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.

Anwendungshinweis: In bestimmten Ländern sind einige Anwendungen, für die dieses Produkt eingesetzt werden kann, patentrechtlich geschützt. Da durch den Kauf keine Lizenzen erworben werden, kann abhängig vom Anwendungsland und der Anwendung der Erwerb entsprechender Lizenzrechte erforderlich sein.

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