

dART

2-Step RT-PCR Kit

- für cDNA-Synthese und RT-PCR -

dART 2-Step RT-PCR Kit
für Reverse Transkription
(cDNA-Synthese) und für RT-PCR

Best. Nr.	Menge
E0802-01	25 Reaktionen
E0802-02	100 Reaktionen

Lagerungsbedingungen:

Lagerung bei -20°C

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 1 nmol dTTP in 10 Minuten bei 37°C in säureunlösliche Form (4) zu überführen.

Zweistufige RT-PCR: Protokollübersicht:

Erster Schritt (dieses Kit): Ausgehend von totaler RNA oder von poly(A)+-RNA wird cDNA synthetisiert. Als Primer können verwendet werden: Oligo(dT), Random Hexamere oder reverse (anti-sense), genspezifische Primer.

Zweiter Schritt: Aliquots der erzeugten cDNA werden als Vorlage (template) für PCR-Reaktionen verwendet. Für dsDNA-Amplifikation werden spezifische Primerpaare verwendet. Opti *Taq* DNA Polymerase, eine optimierte Enzymmischung aus *Taq* und *Pfu* DNA Polymerase, erzeugt PCR-Produkte, die sich sowohl zur Verwendung für TA-Klonierung als auch zur Ligation mit blüdigenden DNA-Enden (blunt) eignen.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase-Aktivitäten geprüft.

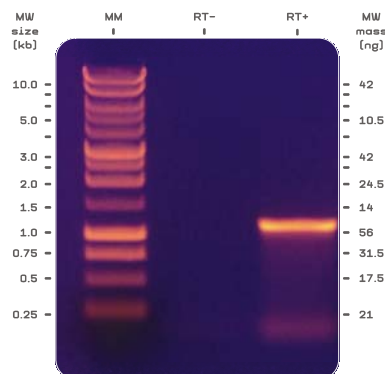


Abb. 1: 2-stufige RT-PCR für *Sus scrofa* type I Arginase.

MW: PerfectPlus 1 kb Ladder (3.5 µl) (Best. Nr. E3131),

RT-: Negativkontrolle, PCR aus gereinigter RNA ohne vorherige cDNA Synthese,

RT+: RT-PCR Produkt der erwarteten Größe (1.1 kb),

Detektionslimit: 1 ng RNA.

Das dART Kit ist optimiert für kritische und empfindliche, zweistufige RT Reaktionen. cDNA wird präzise, in voller Länge und in hoher Ausbeute synthetisiert, auch von in nur in geringer Konzentration vorliegenden "low copy number" RNA-Molekülen. Die hoch optimierte und sorgfältig modifizierte Reverse Transkriptase ermöglicht besonders spezifische RT Reaktionen.

Beschreibung:

- dART Reverse Transkriptase (RT) ist eine modifizierte RNA abhängige DNA Polymerase. Ausgehend von einzelsträngiger RNA und mit einer reversen Start-DNA (Primer) beginnend, synthetisiert dART RT einen komplementären DNA-Strang.
- Für cDNA Synthesen und zweistufigen RT-PCR Reaktionen, die besondere Empfindlichkeit und hohe Spezifität erfordern.
- Synthetisiert einzelsträngige cDNA aus RNA-Vorlagen in einem breiten Temperaturspektrum zwischen 35°C und 55°C.
- Deutlich erhöhte Effizienz im Vergleich zu einstufigen RT-PCR Reaktionen. Keine Einbußen bei der Sensitivität und bei der cDNA Ausbeute. Da RT und PCR Reaktionen sehr unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, werden ungewollte Kompromisse bei den Reaktionsbedingungen vermieden. Zudem kann bei zweistufigen Synthesen im Bedarfsfall auf verbliebene Aliquots der cDNA zurückgegriffen werden.
- Hohe cDNA Ausbeuten und reverse Transkripte in voller Länge aus RNA-Vorlagen mit unterschiedlichem G+C Gehalt. Für Sequenzabschnitte mit sehr hohem G+C Gehalt und extrem stabilen Sekundärstrukturen empfehlen wir, die thermostabile, native AMV Reverse Transkriptase (Best. Nr. 1372) bei erhöhten Temperaturen von 55°C-65°C zu verwenden.
- Keine RNase Aktivität nachweisbar für einzelsträngige RNA. Verminderte RNase H Aktivität für DNA/RNA Hybridmoleküle. Da RT-Reaktionen keine Amplifikationsreaktionen sind, jeder RNA-Strang also nur ein Mal in cDNA überschrieben wird - und dann als RNA/DNA Hybridmolekül vorliegt -, wirkt RNase H nur auf bereits revers transkribierte DNA/RNA Hybride. Deshalb hat RNase H Aktivität keinen Einfluss auf cDNA-Produktlänge und -ausbeute
- Geeignet für die Herstellung markierter Sonden zur Hybridisierung.

Packungsinhalt:

Reverse Transkription / cDNA Synthese

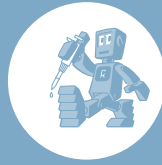
Reagentien ausreichend für 25 oder 100 cDNA-Synthesereaktionen je 20 µl.

Komponente	25 Rkt. Kit	100 Rkt. Kit
dART Reverse Transkriptase	25 µl	100 µl
5 x cDNA Synthesepuffer	150 µl	600 µl
0.1 M DTT	50 µl	200 µl
dNTP Mix (je 5 mM)	150 µl	4 x 150 µl
RNase Inhibitor (12.5 U/µl)	25 µl	100 µl
Oligo(dT) ₂₀ (50 µM)	25 µl	100 µl
Random Hexamere (50 ng/µl)	25 µl	100 µl
Wasser, RNase frei	1.0 ml	4 x 1.0 ml
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	25 µl	100 µl

PCR

Reagentien ausreichend für 25 oder 100 PCR-Reaktionen je 50 µl.

Komponente	25 Rkt. Kit	100 Rkt. Kit
Opti <i>Taq</i> DNA Polymerase 2.5 U/ µl	25 µl	100 µl
10 x Pol Puffer C mit MgCl ₂	1.0 ml	4 x 1.0 ml
dNTP Mix (je 5 mM)	50 µl	200 µl



dART

2-Step RT-PCR Kit

TWO-STEP RT-PCR PROTOKOLL

Ansetzen der RT und PCR Reaktionen:

(1) Primer / RNA / dNTP Mix

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Primer Oligo (dT) ₂₀ [50 µM] Rd. Hexamere [50 ng/µl] Reverser Prim. [10 µM]	1 µl	1x
RNA (10 ng - 5 µg)	x µl	0.5 - 250 ng/µl
dNTP Mix [je 5 mM]	4 µl	1 mM je dNTP
H ₂ O, RNase frei	Auf 13 µl	
Gesamtvolumen Primer / RNA / dNTP Mix	13 µl	

(2) Master Reaction Mix

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
5x cDNA Puffer	4 µl	1x
Ribonuklease Inhibitor, 12.5 U/µl	1 µl	0.625 U/µl
DTT [100 mM]	1 µl	5 mM
dART Reverse Transkriptase	1 µl	
Gesamtvolumen Master Reaction Mix	7 µl	

(3) PCR mit Opti Taq DNA Polymerase

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Template cDNA	2 - 5 µl	0.05 - 1 µg
10 x Pol Puffer C	5 µl	1x
dNTP Mix (je 5 mM)	2 µl	0.2 mM je dNTP
Vorwärts-Primer [10 µM]	1 µl	0.5 µM
Reverser Primer [10 µM]	1 µl	0.5 µM
Opti Taq DNA Polymerase, 2.5 U/µl	1 µl	2.5 U
H ₂ O, RNase frei	Auf 50 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	-

(4) Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	93-95°C	2-5 min	1
Denaturierung	93-95°C	15-30 s	20-40
Annealing	50-68°C	30 s	
Extension	72°C oder 68°C	1 min/1 kb	
Finale Extension	72°C oder 68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Reverse Transkriptase Reaktion / cDNA Synthese

Für cDNA-Synthesen aus kleinen bis mittelgroßen RNA Mengen. Für die cDNA Synthese in voller Länge werden, abhängig vom Anteil des Ziel-RNA-Moleküls in der RNA-Probe, zwischen 10 ng und 5 µg RNA in die Reaktion eingesetzt.

- Vorbereitung des Primer/RNA/dNTP Mix:** Für jede einzelne Reaktion sollten diese Komponenten in einem 0,2 - 0,5 ml Plastikgefäß gemischt werden: RNA, dNTP mix und Primer (50 µM Oligo(dT)₂₀ oder 50 ng/µl Random Hexamere oder 10 µM reverser, genspezifischer Primer). Zusammensetzung siehe Tabelle 1. Das Volumen wird auf 13 µl mit RNase freiem Wasser eingestellt. Pro Reaktion ein eigenes Reaktionsgefäß verwenden.
- Denaturierung:** RNA-Mix für 5 min auf 65°C erhitzen und anschließend auf Eis für weitere 5 min kühlen.
- Puffer mischen:** Den 5 x cDNA Synthesepuffer gründlich vortexten.
- Master Reaction Mix vorbereiten:** Den Master Reaction Mix in einem Reaktionsgefäß auf Eis zusammenfügen und durch Pipettieren auf Eis vorsichtig mischen. Komponenten: 5 x cDNA Synthesepuffer, RNase Inhibitor, 0,1M DTT, dART Reverse Transkriptase. Zusammensetzung siehe Tabelle 2. Der Master Reaction Mix für alle Reaktionen kann in einem einzigen Reaktionsgefäß angesetzt werden.
- Mischen der Reaktionsansätze:** Jeweils 7 µl Aliquots des Master Reaction Mix in eines der Gefäße mit 13 µl Primer/RNA/dNTP-Mix (aus Schritt 1) überführen. Gesamtvolumen der Reaktion: 20 µl. Auf Eis stehen lassen.
- RT Reaktion inkubieren:** Den Reaktionsansatz zügig vom Eis in einen passend vorgeheizten PCR-Cycler überführen. Inkubation wie folgt:
Oligo(dT)₂₀: 30-60 min bei 50°C (oder 35-55°C)
Genspezifisch: 30-60 min bei 50°C (oder 35-55°C)
Random Hexamere: 25°C bei 10 min, gefolgt von 20-50 min bei 50°C (oder 35-55°C).
- RT Reaktion terminieren:** Die Reaktion stoppen durch Hitzeinaktivierung bei 85°C für 5 min.
- RNase H Verdau:** Optional: 1 µl RNase H zufügen und bei 37°C für 20 min inkubieren. Hinweis: RNase H Aktivität wirkt ausschließlich auf DNA/RNA Hybridmoleküle, nicht auf einzelsträngige RNA.
- Beendigung der cDNA Synthese:** Aliquots der cDNA können sofort als Kopiervorlage für PCR verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

PCR Reaktion mit Opti Taq DNA Polymerase

- MgCl₂:** 2-5 µl der cDNA werden als Kopiervorlage (template) in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ beträgt 1,5 mM - für die meisten PCR-Reaktionen optimal. Manchmal werden höhere MgCl₂-Konzentrationen benötigt. 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl₂-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0,5 mM.
- Mischen:** Alle Komponenten der PCR-Reaktion werden in einem 0,2 - 0,5 µl Plastikreaktionsgefäß zusammengefügt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3). Alle Bestandteile vorsichtig durch Pipettieren vermischen.
- PCR-Bedingungen:** Einleitende Denaturierung bei 94°C für 3 min, anschließend 20-40 PCR-Zyklen mit probenspezifischen PCR-Bedingungen durchführen (Extensionszeit 1 min/kb bei 68-72°C). Siehe Tabelle 4.
- Gel Elektrophorese:** 10-20 µl des PCR-Produktes werden auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese analysiert.

Logblätter / Protokollbogen

Standardisierte Logblätter für RT- und für PCR-Reaktionen stehen online bereit:

RT
<http://www.roboklon.de/rt>
PCR
<http://www.roboklon.de/pcr>