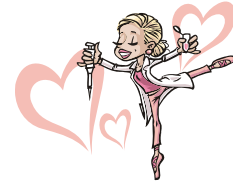


NG dART 2-STEP RT-PCR KIT

- für zweistufige RT-PCR Reaktionen -



NG dART RT-PCR Kit für 2-stufige RT-PCR Reaktionen

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

Lagerungsbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Komponente	25 Rxn Kit	100 Rxn Kit
NG dART RT Mix	25 µl	100 µl
5 x NG dART Puffer	100 µl	400 µl
Oligo(dT) ₂₀ (50 µM)	25 µl	100 µl
Random Hexamere (200 ng/µl)	25 µl	100 µl
dNTP Mix, je 5 mM	50 µl	200 µl
OptiTaQ DNA Polymerase 2,5 U/µl	25 µl	100 µl
10x Puffer Pol C mit MgCl ₂	250 µl	1.0 ml
RNase freies Wasser	1 x 1.0 ml	4 x 1.0 ml

Zweistufige RT-PCR: Protokoll-Übersicht:

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. Geeignete Enzympräparationen für quantitative, optische PCR-Methoden sind SG qPCR Master Mix (Best. Nr. E0401, E0411), Probe Master Mix (E0420, E0422) bzw. HotStart Perpetual Taq DNA Polymerase (E2700). Soll amplifizierte cDNA kloniert oder sequenziert werden, empfehlen wir OptiTaQ DNA Polymerase (E2600) oder OptiTaQ Master Mix (E2910).

Qualitätskontrolle:

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

Das dART Kit ist optimiert für kritische und empfindliche 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:

- Für sensitive und spezifische cDNA Synthesen und Zweischritt-RT-PCR Reaktionen.
- Das NG dART RT Kit enthält dART Reverse Transkriptase und einen RNase Inhibitor mit spezifischer Wirkung auf RNasen A, B und C. Der optimierte 5x NG cDNA Puffer enthält dNTPs.
- Synthetisiert einzelsträngige cDNA aus RNA-Vorlagen in einem breiten Temperaturspektrum zwischen 35°C und 65°C.
- Hohe cDNA Ausbeuten und reverse Transkripte in voller Länge aus RNA-Vorlagen mit unterschiedlichem G+C Gehalt.
- Keine RNase Aktivität nachweisbar für einzelsträngige RNA. Verminderte RNase H Aktivität für DNA/RNA Hybridmoleküle. Da RT Reaktionen keine Amplifikationsreaktionen sind, hat die RNase H Aktivität keinen Einfluss auf cDNA-Produktlänge und -ausbeute
- Geeignet für die Herstellung markierter Sonden zur Hybridisierung.

Reaktionstemperatur 1° C



Abb. 1: Temperaturgradienten - RT-PCR eines Genfragmentes von *Sus scrofa* Arginase I. Reverse Transkription erfolgte mit NG dART Reverse Transkriptase aus totaler RNA (isoliert aus Lebergewebe mit dem GeneMatrix Universal RNA Kit, Best. Nr. E3598). PCR-Amplifikation mit OptiTaQ DNA Polymerase. Amplikonlänge: 1137 bp.

dART Reaktionsprotokoll, cDNA Erststrangsynthese:

1. 5x NG cDNA Puffer auftauen, vortexen und auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen. Eventuell vorhandener weißer Niederschlag im Reaktionspuffer sollte sich vollständig auflösen. Der vollständig klare Puffer ist zur Benutzung bereit.
2. In einem RNase-freien Plastikgefäß die RT-Reaktion wie folgt zusammenfügen:

Komponente	Menge
5x NG cDNA Puffer	4 µl
Primer*	1 µl
RNA (10 ng-5 µg)	x µl
NG dART RT Mix	1 µl
RNase freies Wasser	@ 20 µl

Gesamtvolumen: 20 µl.

* Primer: 50 µM Oligo(dT)₂₀, 200 ng/µl Random Hexamer Primer, oder 10 µM reverser, genspezifischer Primer.

3. Den Thermalzykler auf eine geeignete Temperatur vorheizen. Den vorbereiteten Reaktionsansatz direkt in den vorgeheizten Zykler überführen. Temperaturen für Reaktionsansätze:

Oligo(dT) ₂₀ Primer	30-60 min @ 50°C (oder 35-65°C)
Genspezifischer Primer	30-60 min @ 50°C (oder 35-65°C)
Random Hexamer Primer	10 min @ 25°C, gefolgt von 20-50 min @ 50°C (oder 35-65°C)

50°C ist die geeignete Temperatur für die meisten Vorlagen. Bei schwierigen Sekundärstrukturen oder bei GC-reichen Vorlagen kann eine Temperatur bis zu 65°C gewählt werden.

4. Die Reaktion durch thermische Inaktivierung beenden (5 Minuten bei 85°C).

5. Die cDNA ist bereit zur weiteren Verwendung, beispielsweise als Kopiervorlage für PCR-Reaktionen. 2 - 5 µl cDNA werden für einen PCR-Reaktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen benötigt. Alternativ kann cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

PCR mit OptiTaQ Polymerase:

Komponente	Menge
cDNA Vorlage ("Template")	2 - 5 µl
10 x Puffer Pol C	5 µl
dNTP Mix [je 5 mM]	2 µl
5'-Primer [10 µM] (Vorwärts)	1 µl
3'-Primer [10 µM] (Revers)	1 µl
OptiTaQ DNA Polymerase [2.5 U/µl]	1 µl
RNase freies Wasser	@ 50 µl

Gesamtvolumen: 50 µl.

6. Durch Pipettieren vorsichtig mischen.

7. Bei 94°C für 3 Minuten inkubieren, dann 20 - 40 Zyklen mit probenspezifisch optimierten PCR Bedingungen durchführen (1 Minute je KB Extensionszeit bei 68-72°C).

8. 10 bis 20 µl der PCR Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese analysieren.