

Protokół reakcji odwrotnej transkrypcji (Ver.260209)

Protokół reakcji odwrotnej transkrypcji:

Proponowany przez nas protokół odwrotnej transkrypcji zawiera przepis przeprowadzania reakcji w warunkach optymalnych do syntezy większości cDNA. Jednakże, w zależności od potrzeb, możliwe jest wprowadzanie odpowiednich modyfikacji i dostosowanie poniższej procedury do Państwa indywidualnych potrzeb.

1. W próbówce umieszczonej w lodzie zmieszać następujące składniki reakcji:

SKŁADNIKI REAKCJI		ILOŚĆ
MATRYCA RNA		
lub	RNA total	0,1 – 5 µg
	poli(A) RNA	0,5 - 10 ng
	specyficzny RNA	0,01 pg i mniejsze
STARTERY		1 µl
lub	Specyficzne 15-20 pmol/µl	
	losowe 6-nukleotydowe (random primers) 0,5 µg/ml	
	Oligo(dT) ₁₅ 0,5 µg/ml	
WODA		Do 18 µl

2. Składniki reakcji starannie wymieszać a następnie zwirować.
3. Mieszaninę inkubować 5 min. w 70 °C, następnie umieścić próbkę w lodzie. Po schłodzeniu zwirować.
4. Umieścić próbkę w lodzie i dodać następujące składniki reakcji:

SKŁADNIKI REAKCJI	ILOŚĆ
10× bufor M-MLV	2,5 µl
1.5mM dNTPs mix	4 µl
M-MLV odwrotna transkryptaza	0,5 µl

5. Inkubować mieszaninę 60 min. w 37°C.

W przypadku zastosowania starterów losowych - random hexaprimers, należy w pierwszej kolejności przeprowadzić inkubację wstępną przez 10 min. w 25°C, a następnie 60 min. w 37°C)

6. W celu zakończenia reakcji mieszaninę inkubować 10 min. w 70°C, następnie umieścić probówkę w lodzie.**Zalecenia:**

- Wykorzystanie poli(A) RNA zamiast całkowitego RNA pozwala istotnie podnieść specyficzność i efektywność reakcji syntezy cDNA.
- Startery oligo d(T)₁₅ (w przeciwieństwie do starterów losowych) nie wymagają szczególnej optymalizacji warunków reakcji.
- Należy zwrócić uwagę na współzależność pomiędzy stężeniem starterów losowych a ilością matrycy, od której zależy długość uzyskiwanego cDNA. Zwiększenie stężenia losowych starterów prowadzi do syntezy krótkich (około 600 nukleotydowych) cDNA, natomiast zmniejszenie ich stężenia będzie sprzyjać syntezie dłuższych odcinków cDNA.
- Problemy związane z obecnością w RNA struktur drugorzędowych oraz sekwencji bogatych w G i C można zmniejszyć poprzez podniesienie temperatury reakcji do 45°C (zamiast 37°C) lub poprzez dodanie DMSO do mieszaniny reakcyjnej. Należy jednak pamiętać, że może to prowadzić do zmniejszenia wydajności syntezy cDNA.

Ograniczenia w zastosowaniu: Ten produkt został zaprojektowany i wykonany wyłącznie do celów badawczych. Nie został przetestowany w kierunku zastosowania do celów diagnostycznych i do bezpośredniej produkcji leków oraz do celów związanych z produkcją leków.

UWAGA! Pewne składniki buforu reakcyjnego oraz buforu służącego do przechowywania mogą działać silnie drażniąco. Radzimy podczas pracy ze wszystkimi związkami chemicznymi przestrzegać ogólnie obowiązujących przepisów BHP.