

Protokół reakcji odwrotnej transkrypcji (Wer.260209)
Protokół reakcji odwrotnej transkrypcji:
I. ETAP PIERWSZY– synteza cDNA

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		
lub	Specyficzne 15-20 pmol/µl	1 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
bufor M-MLV (10×)	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.

II. ETAP DRUGI – reakcja amplifikacji DNA

7. W poniższym protokole chcielibyśmy zaproponować Państwu zoptymalizowaną procedurę reakcji amplifikacji DNA. Niemniej, w zależności od własnych doświadczeń, zalecamy modyfikacje i dostosowanie poniższej procedury do Państwa indywidualnych potrzeb.
8. W celu przeprowadzenia reakcji należy w zmieszać następujące składniki:

bufor RED AllegroTaq (10×)	2,5 µl
1.5 mM mieszanina dNTP	2 µl
polimeraza DNA RED AllegroTaq	0,5 µl
cDNA	2 µl
starter F (50 pmol/µl)	1 µl
starter R (50 pmol/µl)	1 µl
woda wolna od RNAz	do 25 µl

9. Składniki reakcji zmieszać a następnie zwirować.
10. Umieścić probówkę w termocyklerze i ustawić optymalnie parametry reakcji amplifikacji.
11. Otrzymany przy użyciu polimerazy RED AllegroTaq produkt amplifikacji można nanosić z probówki bezpośrednio na żel (stosowanie dodatkowego buforu obciążającego nie jest wymagane). Zazwyczaj nakładana objętość nie jest większa niż 5-10ul mieszaniny reakcyjnej.
12. **Produkt należy przechowywać w temp. -20°C lub w -70°C w przypadku długotrwałego przechowywania.**

Otrzymany produkt może zostać wykorzystany jako matryca w reakcji amplifikacji z wewnętrznymi starterami – *nested PCR*. W tym przypadku należy zmieszać składniki mieszaniny reakcyjnej zgodnie z p1. tego rozdziału, lecz zamiast cDNA zaleca się dodanie 2 µl produktu amplifikacji uzyskanego we wcześniejszej reakcji.

Prosimy pamiętać, że dwuetapowa reakcja odwrotnej transkrypcji i amplifikacji cDNA obarczona jest większym ryzykiem kontaminacji niż reakcja jednoetapowa, dlatego do jego przygotowania zaleca się używać końcówek z filtrem zatrzymującym zanieczyszczenia aerozolowe.

Należy również pamiętać, aby w pobliżu nie przechowywać otwartych probówek z produktami reakcji PCR, zużytych końcówek itp. Należy również każdorazowo stosować kontrolę negatywną (bez matrycy).

W razie wykrycia nawet najmniejszej kontaminacji badanej próbki należy zmienić wszystkie używane do tej pory składniki reakcji (bufory, startery, enzymy) oraz upewnić się, czy pipety wykorzystywane podczas przygotowywania reakcji nie są zabrudzone (w szczególnych przypadkach może okazać się konieczna zmiana miejsca wykonywania reakcji).

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.