

Instrukcja

TranScriba™ 1step PCR Mix Probe

Zestaw do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi.

numer katalogowy	wielkość
2008-100Q	100 reakcji w 25 µl
2008-200Q	200 reakcji w 25 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Opis

TranScriba™ 1step PCR Mix Probe jest gotową mieszaniną do odwrotnej transkrypcji i reakcji real-time PCR z sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. TranScriba™ odwrotna transkryptaza jest oparta na MMLV odwrotnej transkryptazie opracowanej dla reakcji qPCR. TranScriba™ odwrotna transkryptaza osiąga optymalną aktywność w temp. 50 °C podczas reakcji one-step qRT-PCR z zastosowaniem 1step PCR Mix Probe.

Mieszanina zawiera wszystkie składniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji, poza matrycą RNA, starterami i sondami.

Stosowanie gotowych mieszanin qPCR oszczędza czas i ogranicza niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki przez zmniejszenie ilości kroków pipetowania i wymaganych w reakcji qPCR.

Mieszanina jest zoptymalizowana pod kątem wydajnego i powtarzalnego one-step qRT-PCR.

Skład

	2008-100Q	2008-200Q	przechowywanie
1step PCR Mix Probe	1 x 1,25 ml	2 x 1,25 ml	-20 °C
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	1 x 50 µl	1 x 100 µl	-20 °C
inhibitor RNaz	1 x 60 µl	1 x 60 µl	-20 °C
DTT	1 x 50 µl	1 x 50 µl	-20 °C
woda jałowa	1 x 1,5 ml	2 x 1,5 ml	-20 °C

Skład mieszaniny 1step PCR Mix Probe

składnik
polimeraza DNA <i>Taq</i>
MgCl₂
dNTPs
2x bufor reakcyjny

Uwagi

- Przed użyciem całkowicie rozmrozić w lodzie, delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
- Używać plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od RNaz.
- Pracować sterylnie (jak przy pracy z RNA), używać jednorazowych rękawiczek i zmieniać je każdorazowo, kiedy wymaga tego dobra praktyka laboratoryjna.
- Cykliczne, siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.

Barwnik referencyjny ROX

Niektóre aparaty do PCR wykonują korekcję sygnału fluorescencji i zaleca się stosowanie barwnika referencyjnego ROX do normalizacji sygnału. Należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta aparatu dotyczącymi dodawania barwnika referencyjnego ROX i jego stężenia.

Przykładowy protokół przygotowania reakcji

1.
- Rozmrozić wszystkie składniki na lodzie, wymieszać, a następnie krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2.
- Umieścić sterylne probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji PCR		
	10 µl	20 µl	25 µl
1step PCR Mix Probe	5 µl	10 µl	12,5 µl
inhibitor RNaz	0,1 µl	0,2 µl	0,25 µl
starter 1***	0,05 - 0,5 µM*	0,1 - 1 µM*	0,1 - 1 µM*
starter 2***	0,05 - 0,5 µM*	0,1 - 1 µM*	0,1 - 1 µM*
sonda***	0,06 µM**	0,12 µM**	0,15 µM**
DTT	0,1 µl	0,2 µl	0,25 µl
TranScriba™ odwrotna transkryptaza	0,2 µl	0,4 µl	0,5 µl
matryca RNA lub mRNA	0,1 pg - 100 ng RNA	0,1 pg - 100 ng RNA	0,1 pg - 100 ng RNA
	0,1 pg - 1 ng mRNA	0,1 pg - 1 ng mRNA	0,1 pg - 1 ng mRNA
	mRNA		
woda jałowa	uzupełnić do 10 µl	do 20 µl	do 25 µl

* zalecane dla standardowego qPCR
** ilość każdej sondy powinna zostać zoptymalizowana
*** końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej

3.
- Mieszanie reakcyjną delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
4.
- Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program qRT-PCR.

Uwaga. Specyficzne warunki RT-PCR są zoptymalizowane dla każdej sondy/amplikonu. Trudne matryce (RNA bogate w pary GC czy RNA z drugorzędową strukturą) wymagają zazwyczaj dłuższych czasów denaturacji i wydłużania.

etap	temperatura	czas
odwrotna transkrypcja	50 °C	10 min
wstępna denaturacja	95 °C	3 min
40 cykli	95 °C	15 - 30 s
	58 - 70 °C*	15 - 60 s**

* w zależności od temperatury przyłączania/wydłużania sond i starterów
** w zależności od długości produktu PCR i/lub ilości amplikonów w probówce



A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 600 776 268, 883 323 761
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2025-1

