

cDNA synthesis kit

First-Strand cDNA Synthesis System

Verze 1.2



Obsah soupravy a její skladování

Tato souprava pro reverzní transkripci obsahuje reagentie potřebné k provedení reverzní transkripce (RT) totální RNA na jednořetězcovou cDNA.

Souprava je využitelná pro kvantitativní konverzi až 2 µg totální RNA na cDNA v jedné 20µl reakci. Takto produkovaná cDNA je vhodná ke krátkodobému i dlouhodobému skladování.

Generovaná jednořetězcová cDNA je vhodným vstupním materiálem pro kvantitativní PCR aplikace s použitím chemie SYBR Green. Reakční souprava je optimalizována tak, aby výstupem následné PCR reakce byly reprodukovatelně nízké Ct hodnoty srovnatelné s populárními konkurenčními výrobky.

Unikátní složení soupravy bylo vyvinuto a optimalizováno pro dosažení maximálního výtěžku reakce a vysoké účinnosti následných procesů.

Po prvním rozmrazení reagentií citlivých na opakované zmrazení a rozmrazení (směs random-primerů; směs dNTP) doporučujeme provést alikvotaci nebo jejich krátkodobé skladování při +4 °C v původním objemu.

Reagentie, které mají být skladovány při -20 °C, umístěte do mrazáku BEZ funkce automatického odmrazování (defrost, nofrost).

Všechny reagentie před použitím pečlivě promíchejte s následnou krátkou centrifugací. Enzym nevortexujte!

Při řádném skladování je garantována funkčnost všech složek soupravy 12 měsíců od data dodání.

Přehled všech variant:

Katalogové číslo	Kapacita
KRD-P-0448-10	10 reakcí v objemu 20 µl
KRD-P-0448-25	25 reakcí v objemu 20 µl
KRD-P-0448-50	50 reakcí v objemu 20 µl
KRD-P-0448-100	100 reakcí v objemu 20 µl

Potřebné přístroje a pomocná zařízení

PCR cycler + termoblok

Laminární box

Automatické pipety jednokanálové

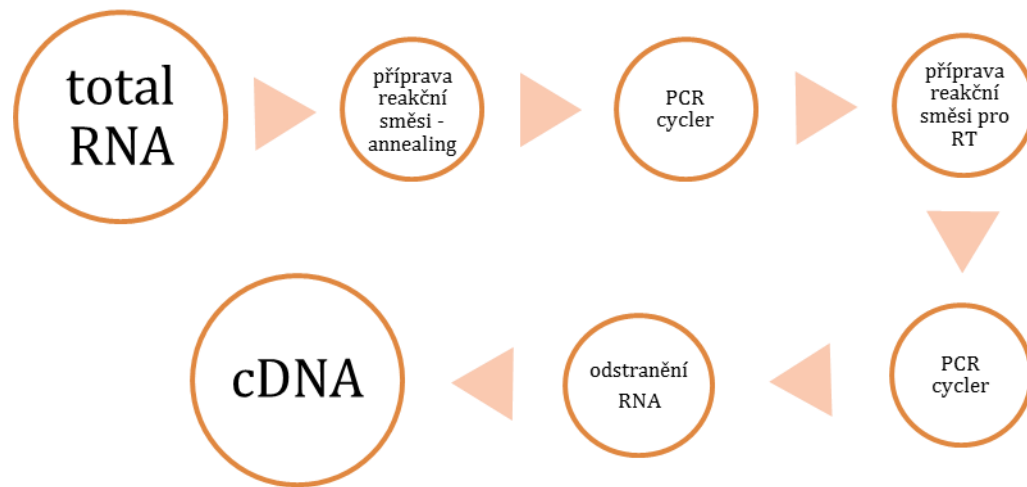
Vortex

Minispin

Upozornění a bezpečnostní zásady

- Minimalizujte nebezpečí při manipulaci s chemikáliemi, přečtěte si předem bezpečnostní listy.
- Používejte vhodné ochranné pomůcky při styku s reagensy a odpadem.
- Dodržujte všechny předpisy a zákony související s nakládáním s chemickými látkami (skladování, manipulace a likvidace).
- Neshromažďujte odpad do skleněných nádob, odpad ukládejte nejlépe do polyetylenového jednorázového kontejneru opatřeného bezpečnostním víkem.
- Likvidujte odpad v souladu se zásadami správné laboratorní praxe a místně stanovenými zákony a nařízeními nebo zdravotními předpisy.
- Všechny biologické vzorky (tkáně, tělní tekutiny, infekčních agens) jsou potenciálně infekčním materiálem, používejte vhodné ochranné pomůcky.
- Veškerá práce musí být prováděna v zařízeních vyhovujících bezpečnostním požadavkům.
- Pracovníci musí být vyškoleni pro zacházení s jednotlivými přístroji a obeznámeni s platnými bezpečnostními a hygienickými předpisy.
- Duševní vlastnictví. Central European Biosystems s.r.o. je vlastníkem veškerých práv duševního vlastnictví ve vztahu k tomuto dokumentu, pokud není výslovně uvedeno jinak. Reprodukce, převod, rozšiřování částí nebo celého obsahu v jakékoliv podobě bez předchozího písemného souhlasu společnosti Central European Biosystems s.r.o je zakázáno.

Reakční schéma



Protokol na syntézu 1. řetězce cDNA s RNázovým inhibítorem a RNázou H

1 *Annealing random primerů na totální RNA*

Je doporučeno, aby vstupní templát RNA byl:

- nekontaminovaný inhibitory reverzní transkripce a PCR reakce,
- rozpuštěn ve vodě nebo (TE) pufru kompatibilním s PCR reakcí,
- bez RNázové aktivity.

Jako vstupní množství totální RNA do 20 μ l reakce použijte **1 až 2 μ g** této RNA.

1.1 Před provedením samotné reakce nechte rozmrazit komponenty kitu při 4 °C.

V tomto kroku dochází k nasednutí random primerů na templát.

Do sterilní zkumavky připravte reakční směs smícháním složek podle tab. I, dopočtete objem komponent potřebných k přípravě 10 μ l reakce.

Reakční směs připravujte na ledu.

Tabulka I: Příprava reakční směsi

Reagencie	Množství [μ l]
random-primery (6,25x)	1,6
totální RNA (1 až 2 μ g)	x
Rnase-free voda	10-x-1,6
<i>Celkový objem reakce</i>	<i>10</i>

Reakční směs promíchejte jemným pipetováním tak, aby nedocházelo ke vzniku bublin a uzavřete. Mikrozkušavku krátce stočte.

1.2 Zkušavku s reakční směsí vložte do PCR cycleru s termálním blokem, reakci proveďte za následujících podmínek:

- i. Inkubace při 70 °C, 5 minut (zapnuté vyhřívání víčka termobloku).
- ii. Inkubace při 4 °C, 1 minutu.

2 *Reverzní transkripce 1. řetězce cDNA*

2.2 Reakční směs pro reverzní transkripci připravte na ledu podle tabulky II smícháním komponent do sterilní zkumavky.

Tabulka II: Příprava reakční směsi (pro celkovou 20 μ l reakci)

Reagencie	množství [μ l]
10x M-MuLV pufr	2
M-MuLV reverzní transkriptáza	1
Směs dNTP (20x)	1
RNase inhibitor	1
RNase-free voda	5
Reakční směs z bodu 1	10
<i>Celkový objem</i>	<i>20</i>

Reakční směs promíchejte jemným pipetováním tak, aby nedocházelo ke vzniku bublin a uzavřete víčkem. Mikrozkušavku krátce stočte, aby se na dno dostal celý její obsah.

- 2.1 Mikrozkušavku s reakční směsí umístěte do PCR cykleru s termálním blokem a spusťte reakci podle nastavení:
 - i. Inkubace při 25 °C, 10 minut.
 - ii. Inkubace při 42 °C, 60 minut (se zapnutím vyhřívání víčka termobloku).
 - iii. Inkubace při 70 °C, 15 minut (se zapnutím vyhřívání víčka termobloku).
 - iv. Inkubace při 4 °C, 1 minutu.
- 2.2 Pro odstranění RNA přidejte 1 μ l RNÁzy H, která je součástí soupravy. Reakční směs následně vraťte do PCR cykleru a inkubujte při 37 °C, 20 minut.
- 2.3 20 μ l získané cDNA uchovejte při 2 až 8 °C krátkodobě při použití do 24 hodin. Dlouhodobě uchovávejte při teplotě v rozmezí od -15 °C do -20 °C.
- 2.4 Před použitím pro kvantitativní real-time PCR doporučujeme cDNA 1x až 4x zředit.

Přílohy

Návod na řešení potíží

Problém	Možná příčina	Řešení
malý výtěžek reakce	pravidelně nerevidovaný PCR cycler	optimalizace teplot a délky reakcí pro daný přístroj
	příliš nízké vstupní množství totální RNA	použití koncentrace RNA doporučené v protokolu
	denaturovaná/znečištěná vstupní RNA	manipulace s RNA ve sterilním prostředí na odděleném místě od jiných NK a reagensů, omezení počtu zmrazování/rozmrazování
	nízká koncentrace/nízká kvalita vstupní RNA	opakovaná izolace RNA z primárního vzorku
není zjištěn žádný produkt reakce	chyba při pipetování nebo nedodržení správného pracovního postupu	kontrola použitého přístrojového vybavení, zopakování pokusu, kontrola koncentrací a skladovacích podmínek všech reagensů
	teplota reakce reverzní transkripce	kontrola teploty termobločku při přestupu teploty do kapaliny
kontaminace reagensů (primery, cizorodou NK, chemickými činidly)	nesterilní podmínky při manipulaci se soupravou	práce v oddělených prostorech určených pro pre- a post-PCR aplikace; alikvotace
vzduchové bubliny v reakčním mixu	prudké míchání/vortexování mixu	dlouhodobější centrifugace v chlazené minicentrifuze