



Universal MM Probe Multiplex OneStep RT-qPCR Kit

Universal MM Probe Multiplex OneStep RT-qPCR Kit to jednoetapowy zestaw, który zapewnia dokładną ocenę ilości cząsteczek RNA podczas analizy ekspresji genów, przy użyciu podwójnie znakowanych sond obecnych w łatwej do użycia mieszance reakcyjnej (MM - ang. *Master Mix*). MM zawiera wszystkie składniki niezbędne do wydajnej reakcji RT-qPCR wraz z unikalną odwrotną transkryptazą, wysoce procesywną polimerazą Taq DNA typu „hot start” oraz barwnikiem referencyjnym ROX.

Universal MM Probe Multiplex OneStep RT-qPCR Kit

Zawartość zestawu:

Składniki	Nr kat. E0831-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0831-02 500 reakcji po 25 µl
2 x RT-qPCR MM*	2 x 625 µl	10 x 625 µl
RNase-free Water	1,2 ml	5 x 1,2 ml

Przechowywanie:

Zestaw należy przechowywać w -20°C.

*Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>2), ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

Opis:

- 2 x RT-qPCR MM jest uniwersalnym rozwiązaniem do ilościowej reakcji RT-qPCR z użyciem specyficznych względem sekwencji sond i może być stosowany w większości dostępnych termocyklerów.
- 2 x RT-qPCR MM zawiera unikalną odwrotną transkryptazę o wysokiej czułości, polimerazę Taq DNA oraz inhibitor RNaz.
- Odwrotna transkryptaza działa w szerokim zakresie temperatur (35-55°C) bez utraty specyficzności i czułości.
- Syntezę cDNA i reakcję PCR przeprowadza się w jednej probówce przy użyciu specyficznych starterów oraz RNA albo mRNA.
- Polimeraza Taq DNA typu „hot start” jest modyfikowanym enzymem o zablokowanej w temperaturze pokojowej aktywności polimerazy. Aktywność polimerazy przywracana jest podczas wstępnego etapu denaturacji w 95°C przez 10 minut.
- 2 x RT-qPCR MM zawiera dNTPs i barwnik ROX. Użycie pasywnego barwnika referencyjnego ROX jest wymagane we wszystkich cyklerach PCR w czasie rzeczywistym z Applied Biosystems i opcjonalnie w cyklerach Stratagene. Barwnik ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencji między studzienkami wynikające z niewielkich różnic w objętości reakcji i fluktuacji fluorescencji. ROX nie bierze udziału w reakcji PCR i nie zakłóca reakcji PCR w czasie rzeczywistym w żadnym termocyklerze.

Protokół:

Składnik	Ilość w reakcji	Stężenie końcowe
2 x RT-qPCR MM	12,5 µl	1 x
Starter forward	Zmienna	0,2-0,4 µM
Starter reverse	Zmienna	0,2-0,4 µM
Sonda	Zmienna	0,1-0,2 µM
Matryca RNA	Zmienna	1 pg-500 ng
RNase-free Water	Do 25 µl	-
Całkowita objętość	25 µl	-

Uwagi:

1. 2 x RT-qPCR MM należy przed użyciem rozmrozić i delikatnie wymieszać za pomocą pipety. Reakcję nastawiać na lodzie oraz ograniczać dopływ światła, ponieważ może to wpłynąć na zmniejszenie intensywności sygnału fluorescencji. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania 2 x RT-qPCR MM.
2. Reakcję należy nastawiać w 25 µl, ponieważ jest to odpowiednia objętość reakcji dla większości termocyklerów. Inna objętość reakcji może być stosowana, jeśli zalecane jest to dla konkretnego urządzenia.
3. Optymalna długość amplifikowanej sekwencji w reakcji RT-qPCR przy użyciu sond to 70-150 bp.
4. Aby uniknąć amplifikacji genomowego DNA należy zaprojektować startery egzon-egzon.
5. Reakcję należy nastawiać na lodzie, aby zminimalizować degradację matrycy RNA.
6. RNA (≤500 ng/reakcję) powinno być dodawane do pojedynczej próbki z reakcją PCR lub do dołków zawierających całą mieszaninę reakcyjną. Należy krótko zwirować wszystko przed umieszczeniem próbek w termocyklerze. Sprawdzić czy nie ma pęcherzyków powietrza, jeśli są, to należy zwirować ponownie.
7. Umieścić próbki w termocyklerze i rozpocząć program.
8. Odwrotna transkryptaza działa w szerokim zakresie temperatur (35-55°C). Rekomendowana temperatura dla odwrotnej transkryptazy to 50°C. Dla poszczególnych eksperymentów temperatura może zostać zmieniona.
9. 2 x RT-qPCR MM ma zoptymalizowany skład i nie ma potrzeby dostosowywania żadnego składnika poza starterami, sondami i stężeniem RNA.
10. Optymalne końcowe stężenie starterów powinno wynosić 0,4 µM, ale może być dostosowane w zależności od potrzeb w zakresie od 0,1 µM do 1 µM. Wraz ze wzrostem stężenia starterów może zwiększyć się wydajność reakcji PCR, ale może to negatywnie wpłynąć na specyficzność reakcji RT-qPCR. Optymalne stężenie starterów zależy od poszczególnej reakcji i urządzeń stosowanych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.
11. Optymalna temperatura topnienia (T_m) starterów powinna wynosić 60°C. T_m podwójnie znakowanych sond powinna być o 8-10°C wyższa od T_m starterów.
12. Dostosować wartość progową do analizy każdego cyklu.
13. Unikać nukleotydu G na 5'-końcu w podwójnie znakowanych sondach, ponieważ może to powodować wygaszenie sygnału fluorescencji.

Warunki reakcji PCR:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	15 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	40-45
Przyłączanie/wydłużanie starterów	60°C	40-60 s	
Chłodzenie	4°C	∞	1

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23