



1-STEP RT-PCR KIT

- für einstufige RT-PCR Reaktionen -



*Reverse Transcriptase
„Hot Start“ DNA Polymerase
RNase Inhibitor*

Artikel Nr.	Größe
E0803-01	25 Reaktionen
E0803-02	100 Reaktionen

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C

Qualitätskontrolle:
Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft

Komponente	25 Rxn Kit	100 Rxn Kit
Master Enzyme Mix (Reverse Transcriptase, "Hot Start" DNA Polymerase, RNase Inhibitor)	25 µl	100 µl
2x Master Buffer Mix	350 µl	2 x 700 µl
RNase freies Wasser	1.0 ml	4 x 1.0 ml

RNA als Ausgangsmaterial einsetzen, RT-PCR Produkt in einem einzigen Arbeitsschritt erhalten: Das dART OneStep RT-PCR Kit ist ein praktisches System für einstufige RT-PCR Reaktionen.

Beschreibung:

- Das dART OneStep RT-PCR Kit enthält eine Enzymmischung aus der hochprozessiven dART reversen Transkriptase, eine thermostabilen "HotStart" DNA Polymerase, sowie einen einzigartigen RNase Inhibitor, der RNA auch unter erhöhten Temperaturen effektiv vor dem Angriff von Nukleasen zu schützen vermag.
- Der Enzymmix liegt als 2-fach konzentrierte Strammlösung vor und enthält dNTPs, Stabilisatoren wie auch RT-PCR unterstützende Agenzien. Die Reaktionsbedingungen sind hoch optimiert für das Zusammenspiel von DNA Polymerase, reverser Transkriptase und RNase Inhibitor.
- Während der reversen Transkription bei erhöhten Temperaturen verbleibt die "HotStart" DNA Polymerase vollständig inaktiviert. Erst durch den initialen Denaturierungsschritt wird die DNA Polymerase aktiviert. Somit wird sensitive, effiziente und artefaktfreie PCR Amplifikation gewährleistet.
- Das Kit wurde in Augenmerk auf sensitive Amplifikation von DNA aus beliebiger RNA in einem einstufigen Arbeitsschritt entwickelt. Das Kit eignet sich sowohl für Analysen wie auch für das molekulare Klonieren.
- Kompatibel mit Emulsionsreaktionen, wie z.B. bereitgestellt durch das Micellula Emulsion & DNA Purification Kit (Best. Nr. E600).

dART One Step RT-PCR Protokoll:

Für cDNA-Synthesen aus kleinen bis mittelgroßen RNA Mengen. Zwischen 10 ng und 2 µg RNA werden für die Synthese von cDNA in voller Länge benötigt.

1. Vorbereitung des Reaktionsmix: Für jede einzelne Reaktion sollten diese Komponenten in einem 0,2 ml Plastikgefäß gemischt werden:

Reaktionsmix

- 2x Master Buffer Mix.....12.5 µl
- Kodierender (Sense) Primer [10 µM].....1 µl
- Reverser (Antisense) Primer [10 µM].....1 µl
- RNA [10 ng-2 µg].....x µl
- Master Enzyme Mix.....1 µl
- RNase freies Wasser.....auf 25 µl

Gesamtes Volumen: 25 µl.

2. Den Reaktionsansatz durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig mischen. Falls erforderlich, kurz herunterzenifugieren, um die Flüssigkeit zu sammeln.

3. Den Reaktionsmix in einen Thermozykler überführen. Inkubation wie folgt: 30 min bei 50°C, gefolgt von Standard-PCR mit einer an die Zielprimer angepassten Primerbindungstemperatur (Annealingtemperatur).

Reverse Transkription	50°C	30 min
Einleitende Denaturierung	94°C	5 min
<i>PCR: Zyklische Amplifikation, 30-40 Zyklen</i>		
Denaturierung	94°C	30 s
Primerbindung (Annealing)	50°C-65°C	30 s
Kettenverlängerung (Extension)	72°C	1 min/1 kb
<i>PCR: Ende der zyklischen Amplifikation</i>		
Abschließende Kettenverlängerung	72°C	5 min

4. 5-20 µl der RT-PCR-Reaktion auf einem Agarosegel analysieren. Geeignete Molekulargewichtsmarker als Referenz verwenden.