



dART RT Kit

- für Reverse Transkriptions-Reaktionen -

dART RT Kit
für die cDNA-Erststrang-Synthese
durch Reverse Transkription

Best. Nr.	Menge
E0801-01	25 Reaktionen
E0801-02	100 Reaktionen

Lagerungsbedingungen:

Lagerung bei -20°C

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 1 nmol dTTP in 10 Minuten bei 37°C in säureunlösliche Form (4) zu überführen.

Komponente	25 Rxn Kit	100 Rxn Kit
dART	25 µl	100 µl
5 x cDNA	150 µl	600 µl
Synthesepuffer		
100 mM DTT	50 µl	200 µl
5 mM dNTPs Mix	100 µl	4 x 100 µl
RNase-Inhibitor (12.5 U/µl)	25 µl	100 µl
Oligo(dT) ₂₀ (50 µM)	25 µl	100 µl
Random Hexamere (50 ng/µl)	25 µl	100 µl
RNase freies Wasser	1.0 ml	4 x 1.0 ml
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	25 µl	100 µl

Two-Step RT-PCR: Protocol Overview:

Erster Schritt (dieses Kit): Ausgehend von totaler RNA oder von poly(A)+-RNA wird cDNA synthetisiert. Als Primer können verwendet werden: Oligo(dT), Random Hexamere oder reverse (anti-sense) genspezifische Primer.

Zweiter Schritt: Aliquots der erzeugten cDNA werden als Vorlage (template) für PCR-Reaktionen verwendet. Für dsDNA-Amplifikation werden spezifische Primerpaare verwendet. Geeignete Polymerasen für die molekulare Klonierung sind PfuPlus (Best.Nr. E1118) oder Hybrid DNA Polymerase (Best.Nr. E2950). Für quantitative, optische PCR-Methoden ist die HotStart Perpetual Taq DNA (Cat.No. E2700) Polymerase das Enzym der Wahl. Soll amplifizierte cDNA lediglich sequenziert werden, empfehlen wir OptiTaQ DNA polymerase (E2600).

Qualitätskontrolle:

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

Das dART Kit ist optimiert für kritische und empfindliche RT Reaktionen. cDNA wird präzise, in voller Länge und in hoher Ausbeute synthetisiert, auch von in nur in geringer Konzentration vorliegenden "low copy number" RNA-Molekülen. Die hoch optimierte und sorgfältig modifizierte Reverse Transkriptase ermöglicht besonders spezifische RT Reaktionen.

Beschreibung:

- Für cDNA Synthesen und Zweischritt-RT-PCR Reaktionen, die hohe Empfindlichkeit und hohe Spezifität erfordern.
- Deutlich erhöhte Effizienz im Vergleich zu Einschritt-RT-PCR Reaktionen. Keine Einbußen bei der Sensitivität und bei der cDNA Ausbeute. Da RT und PCR Reaktionen sehr unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, werden ungewollte Kompromisse bei den Reaktionsbedingungen vermieden.
- Synthetisiert einzelsträngige cDNA aus RNA-Vorlagen in einem breiten Temperaturspektrum zwischen 35°C und 55°C.
- Hohe cDNA Ausbeuten und reverse Transkripte in voller Länge aus RNA-Vorlagen mit unterschiedlichem G+C Gehalt. Für Sequenzabschnitte mit sehr hohem G+C Gehalt und extrem stabilen Sekundärstrukturen empfehlen wir, die thermostabile, native AMV Reverse Transkriptase (Best. Nr. 1372) bei erhöhten Temperaturen von 55°C-65°C zu verwenden.
- Keine RNase Aktivität nachweisbar für einzelsträngige RNA. Verminderte RNase H Aktivität für DNA/RNA Hybridmoleküle. Da RT Reaktionen keine Amplifikationsreaktionen sind, hat die RNase H Aktivität keinen Einfluss auf cDNA-Produktlänge und -ausbeute
- Geeignet für die Herstellung markierter Sonden zur Hybridisierung.

dART Reaktionsprotokoll:

Für cDNA-Synthesen aus kleinen bis mittelgroßen RNA Mengen. Abhängig vom Anteil des Ziel-RNA-Moleküls in der RNA-Probe werden zwischen 10 ng und 5 µg RNA in die Reaktion eingesetzt.

1. Vorbereitung des RNA-Mix: Für jede einzelne Reaktion sollten diese Komponenten in einem 0,2 - 0,5 ml Plastikgefäß gemischt werden: 1 µl Primer (50 µM Oligo(dT)₂₀ oder 50 ng/µl Random Hexamere oder 10 µM reverser, genspezifischer Primer), RNA, dNTPs mix. Das Volumen wird auf 13 µl mit RNase freiem Wasser eingestellt:

RNA-Mix

Primer.....	1 µl
RNA (10 ng-5 µg).....	x µl
5 mM dNTPs Mix.....	4 µl
RNase freies Wasser.....	@ 13 µl
Totales Volumen: 13 µl.	

2. Optionaler Schritt: RNA-Mix für 5 min auf 65°C erhitzen und anschließend auf Eis für weitere 5 min kühlen. *

3. Den 5 x cDNA Synthesepuffer gründlich vortexen.

4. Den **Master Reaction Mix** in einem Reaktionsgefäß auf Eis zusammenfügen und durch Pipettieren vorsichtig mischen. Pro Reaktion zufügen:

Master Reaction Mix

5 x cDNA Synthesepuffer.....	4 µl
RNase Inhibitor 12.5 U/µl.....	1 µl
100 mM DTT.....	1 µl
dART Reverse Transkriptase.....	1 µl
Totales Volumen pro Reaktion: 7 µl	

Totales Volumen pro Reaktion: 7 µl

5. Jeweils 7 µl des Master Reaction Mix in eines der Gefäße mit 13 µl RNA-Mix überführen. Gesamtvolumen der Reaktion: 20 µl. Auf Eis stehen lassen.

6. Den Reaktionsansatz zügig vom Eis in einen passend vorgeheizten PCR-Cycler überführen. Die Inkubation erfolgt:

Oligo(dT) ₂₀ Primer	30-60 min bei 50°C (oder 35-55°C)
Genspezifischer Primer	30-60 min bei 50°C (oder 35-55°C)
Random Hexamer	25°C bei 10 min, gefolgt von 20-50 min bei 50°C (oder bei 35-55°C).
Primer	

7. Die Reaktion stoppen durch Inkubation bei 85°C für 5 min.

8. Optionaler Schritt: 1 µl RNase H zufügen und bei 37°C für 20 min inkubieren.

9. Aliquots der cDNA können sofort für PCR verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

10. 2 - 5 µl der cDNA werden als Vorlage für eine anschließende PCR verwendet.

* Der Erhitzungsschritt auf 65°C und das anschließende Abkühlen sind optional. Mit diesem Schritt können bei schwierigen RNA-Vorlagen oder im Falle von starken Sekundärstrukturen deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Bei allen übrigen RNA-Vorlagen verändert sich die Reaktionseffizienz nicht und dieser Schritt kann ausgelassen werden.