

cDNA Synthesis Kit

(One-Step RT-PCR)

مواد و اجزا	تعداد/حجم	دمای نگهداری
cDNA Synthesis Master Mix	400 µl	-20 °C
DEPC - Treated Water	500 µl	
Primer Mix	80 µl	



Viragene®
Cell Discovery Solutions

کیت سنتز cDNA ویراژن با دارا بودن تمام مواد و اجزای مورد نیاز در سه میکروتیوب، سنتز cDNA تک رشته‌ای (Single strand cDNA) از RNA را در کوتاه‌ترین زمان و با آسان‌ترین روش و کمترین آلودگی امکان‌پذیر می‌کند. کیت حاضر با دارا بودن قدرت سنتز cDNA از غلظت‌های پایین RNA امکان انجام واکنش‌های پایین‌دستی از جمله PCR و Real Time PCR را برای کاربر فراهم می‌کند.

ویژگی‌های متمایز کننده کیت:

- سنتز cDNA در کمترین زمان ممکن و آلودگی
- دارای تمام اجزای مورد نیاز برای سنتز cDNA با کیفیت بالا و آماده مصرف (Ready to use)
- سنتز رشته‌های cDNA با غلظت بالا

کاربرد:

سنتز cDNA با استفاده از انواع مختلف RNAها (mRNA , Total RNA, in-vitro transcribed RNA , Viral RNA) توسط این کیت امکان‌پذیر می‌باشد.

موارد مورد نیاز:

- سر سمپلر فیلتردار و RNase/DNase Free
- Vortex و Spin
- میکروتیوب مخصوص PCR
- دستگاه ترموسایکلر

cDNA Synthesis Kit

Components

Volume

باتوجه به جدول زیر، میکس واکنش به میزان ۲۰ µl تهیه گردد:

cDNA Synthesis Master Mix	8 µl
Primer Mix	1.5 µl
Template RNA	5 ng - 1 µg
DEPC - Treated Water	Up to 20 µl

برنامه دمایی:

Step	Time	Temperature	پس از آماده‌سازی، میکس واکنش را با برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر قرار دهید.
Step 1	10 min	25 °C	
Step 2	60 min	50 °C	
Step 3	5 min	80 °C	

مرحله سنتز cDNA از RNA به اتمام رسیده و کاربر می‌تواند برای واکنش‌های PCR, Real-Time PCR و qPCR به میزان ۵-۱۰ µl از cDNA را استفاده کند.

هشدارها و محدودیت‌ها:

- برنامه‌دهی دستگاه حتما طبق پروتکل کیت تنظیم شود. قبل از شروع واکنش سنتز cDNA بهتر است برنامه‌دهی دستگاه ترموسایکلر را تنظیم نمایید و به دمای مورد نظر برسانید.
- قبل از شروع سنتز cDNA همیشه از دستکش استفاده نمایید و پس از پوشیدن دستکش هیچ‌یک از سطوح و وسایل غیر ضروری را لمس نکنید تا بتوان در حدامکان از آلودگی RNase در وسایل و سطوح جلوگیری نمود. همچنین تمامی سطوح کار و ظروف شیشه‌ای خود را با محلول‌های غیرفعال کننده RNase پاکسازی نموده و میز کار خود را با اتانول ۷۰٪ تمیز کنید.
- اجزای کیت در دمای ۲۰°C نگهداری شوند و در حین انجام کار نیز آن‌ها را روی یخ قرار دهید. از فریز و دفریز شدن میکروتیوب‌های حاوی مسترمیکس و پرایمرها جلوگیری نمایید و جهت حفظ پایداری بیشتر، به میزان واکنش‌های مورد نیاز الیکوت نمایید.
- RNA استخراج شده از نمونه‌های بیولوژیک را فوراً استفاده نمایید.
- برای به دست آوردن بهترین نتایج، از نمونه‌های تازه استفاده کنید و در صورت نیاز به نگهداری نمونه‌ها برای مدت کمتر از یک هفته در دمای ۲۰°C و مدت زمان طولانی‌تر در دمای ۷۰°C نگهداری نمایید.
- در صورتی که میزان نمونه RNA استخراج شده دارای غلظت پایینی باشد، برای دریافت نتیجه مطلوب‌تر حجم بیشتری از نمونه مورد نظر برای سنتز cDNA در فرآیندهای پایین دستی مانند PCR/Real-Time PCR مورد استفاده قرار گیرد.

راهنمای عیب‌یابی:

ایرادات	دلایل احتمالی	پیشنهادهات
عدم مشاهده سیگنال در واکنش‌های پایین دستی	الگوی RNA تخریب شده است.	کیفیت RNA استخراج شده عامل کلیدی برای سنتز cDNA است. پیش از انجام واکنش، کیفیت RNA را روی ژل الکتروفورز بررسی کنید و سپس سنتز cDNA خود را شروع کنید.
	مهارکننده RNA در واکنش وجود دارد.	مقادیر کمی از بازدارنده‌ها مانند نمک‌های گوانیدین و پودرهای شیمیایی مانند SDS در RNA استخراج شده می‌توانند سنتز cDNA را مهار کنند. RNA استخراج شده را با اتانول ۹۶٪ رسوب داده و رسوب را با اتانول ۷۵٪ شستشو دهید و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را دور بریزید. سپس رسوب را خشک کرده و در حجم مناسبی (۱۰۰ μl) از DEPC Treated Water حل نمایید.
	DNA ژنومی همراه با RNA استخراج شده وجود دارد	قبل از مرحله انجام واکنش، RNA را با آنزیم DNase I هضم کنید و یا از exon-exon junction پرایمرها استفاده کرده تا از تکثیر DNA ژنومی جلوگیری کنید.