

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit

Ordering Info

TBK1040, 100 rxns of 25 µL

Description

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit is designed for first-strand cDNA synthesis and subsequent PCR in a single-tube reaction procedure, decreasing contamination risk and reducing hands-on time considerably. The kit consists of a RT mix and a PCR Master Mix. The RT mix comprises a modified M-MuLV reverse transcriptase with increased thermostability and lacking RNase H activity, and an advanced RNase inhibitor to impede RNA degradation. The Master mix contains all the reagent (except PCR primers and template) needed for running PCR reactions.

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit can be used with any RNA template, including mRNA, viral RNA and total RNA, as the RTase is not inhibited by rRNA or tRNA. The kit is optimized for rapid one-step, one-tube RNA quantification, reducing experimental variation and contamination with a convenient RT-PCR protocol.

Features

- Thermostable Reverse Transcriptase, allows for cDNA synthesis at 45°C-55°C.
- RNase H deficient.
- Fast Hot-Start PCR Master Mix.
- High yield, specificity, and sensitivity.

Kit Components

Components	TBK1040
PCR Master Mix 2x*	1.25 mL
RT Mix	125 µL
PCR Grade Water, nuclease free	2 mL

* The PCR Master Mix contains the hot-start Taq Polymerase, 6mM MgCl₂, 2mM dNTPs, enhancers and stabilizers.

Storage

Shipped on blue ice. Upon receipt, kit components should be immediately stored at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing. Maintain cold when thawed.

Applications

- One-step RT-PCR.
- Gene expression analysis by endpoint RT-PCR.

Technical Assistance

Please refer any technical questions to support@tiarisbiosciences.com

PROTOCOL

1. Gently vortex and briefly centrifuge kit components after thawing.
2. Place a tube on ice and add the following components for each 20 μ L reaction. Prepare sufficient master mix for the number of reactions. Consider one or two extras:

Components	Volume
PCR Master Mix (2x)	12.5 μ L
Forward primer (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L
RT Mix	1.25 μ L
Template RNA (step 5)	*
PCR Grade Water, nuclease-free	up 25 μ L
Final Volume	25 μL

3. Dispense the master mix into wells of PCR plate.
4. Gently vortex and spin down the samples.
5. Add in each well the RNA sample. Mix well by pipetting.
Template RNA: in case of total RNA 1 pg-1 μ g, in case of mRNA > 0.01 pg (the RNA sample should be completely free of contaminating genomic DNA).
6. Seal the PCR plate with optical film.
7. Set-up RT-PCR cycling:

Suggested thermal cycling conditions:

Process	Cycles	Temperature	Time
cDNA synthesis	1 x	45°C *	10-15 min
Enzyme Activation	1 x	95 °C	3 min
Denaturation	30-40 x	95 °C	10 sec
Annealing		Ta **	10 sec
Extension	1 x	72 °C	15 sec/ kb
Final Extension	1 x	72 °C	1 min
Hold	1 x	4 °C	∞

* For most applications, cDNA synthesis should be carried out at 45°C. In case of targets with high secondary structure, synthesis may be optimized by carrying out at 55°C.

**Ta depends on the Tm of both primers, which in turn depend on the buffer composition. Ideally, primers should have a predicted Tm of about 60°C. In general, using a Ta of 1-3°C above the Tm of the primer with the lowest Tm is a good starting point. It is highly recommended to determine optimum annealing temperature experimentally by performing a temperature gradient.

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit

Referencias

TBK1040, 100 reacciones de 25 µL

Descripción

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit está diseñado para la síntesis de ADN copia y la posterior PCR en una reacción que ocurre en un único tubo, lo que disminuye el riesgo de contaminación y reduce considerablemente el tiempo de manipulación. El kit consta de una RT Mix y una PCR Master Mix. La RT Mix incluye la transcriptasa inversa M-MuLV modificada con una mayor termoestabilidad y carente de actividad RNasa H y un inhibidor avanzado de RNasa para impedir la degradación del ARN. La PCR Master Mix contiene todos los reactivos (excepto los cebadores de PCR y el molde) necesarios para la reacción de PCR.

Tiaris™- One-Step RT-PCR Kit puede utilizar cualquier molde de ARN, incluido el ARNm, el ARN viral y el ARN total, ya que la RTasa no se inhibe por el ARNr o el ARNt. El kit está optimizado para la cuantificación rápida de ARN en un solo paso y en un solo tubo, lo que reduce la variación experimental y la contaminación.

Características

- Reverso Transcriptasa termoestable, permitiendo la síntesis de DNA copia a 45°C-55°C.
- Reverso Transcriptasa sin actividad RNase H.
- La PCR Master Mix incluye una polimerasa fast hot-start.
- Alto rendimiento, especificidad y sensibilidad.

Componentes

Componentes	TBK1040
PCR Master Mix 2x*	1.25 mL
RT Mix	125 µL
PCR Grade Water, nuclease free	2 mL

* PCR Master Mix contiene la hot-start Taq Polymerasa, 6mM MgCl₂, 2mM dNTPs, potenciadores y estabilizadores.

Almacenaje

El kit se envía con hielo azul. Tras su recepción, los componentes del kit deben ser inmediatamente almacenados a -20°C. Evitar ciclos repetidos de congelación/ descongelación. Conservar en frío tras descongelar.

Aplicaciones

- RT-PCR en un solo paso.
- Análisis expresión génica por RT-PCR a tiempo final.

Asistencia Técnica

Por favor contactar con nuestro servicio técnico ante cualquier duda: support@tiarisbiosciences.com

PROTOCOLO

- Tras descongelar los componentes del kit, dar un vortex suave a los tubos y centrifugar brevemente.
- Coloque un tubo sobre hielo y agregue los siguientes componentes para cada reacción de 20 μL . Prepare suficiente mezcla maestra para el número de reacciones. Considere preparar una o dos reacciones adicionales:

Componentes	Volumen
PCR Master Mix (2x)	12,5 μL
Forward primer (10 μM)	1 μL
Reverse primer (10 μM)	1 μL
RT Mix	1,25 μL
ARN Molde (paso 5)	*
PCR Grade Water, nuclease-free	up 25 μL
Volumen Final	25 μL

- Dispensar la master mix en los pocillos de la placa de PCR.
- Dar un vortex suave y un spin a las muestras.
- Añadir en cada pocillo la muestra de ARN. Mezclar bien por pipeteo.
Molde de ARN: en caso de ARN total, 1 pg-1 μg ; en caso de ARNm > 0,01 pg (el ARN debe estar completamente libre de ADN genómico).
- Sellar la placa de PCR con film óptico.
- Programar la RT-PCR.

Proceso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Síntesis de DNA copia	1 x	45°C *	10-15 min
Activación Enzima	1 x	95 °C	3 min
Desnaturalización	30-40 x	95 °C	10 seg
Anillamiento		Ta **	10 seg
Extensión	1 x	72 °C	15 seg/ kb
Extensión Final	1 x	72 °C	1 min
Conservación	1 x	4 °C	∞

*Para la mayoría de las aplicaciones la síntesis de DNA copia debe ser realizada a 45°C. En caso de moldes con una marcad estructura secundaria, la síntesis puede ser optimizada empleando 55°C.

**Ta depende de la Tm de ambos primers que a su vez dependen de la composición del buffer de reacción. Idealmente, los cebadores deberían tener una Tm de aproximadamente 60 °C. En general, utilizar una Ta de 1-3 °C por encima de la Tm del cebador con la Tm más baja es un buen punto de partida. Se recomienda encarecidamente determinar la temperatura de hibridación óptima experimentalmente realizando un gradiente de temperatura.