

cDNA-Erststrangsynthese mit der "SuperScript II RNase H⁻ Reversen Transcriptase" (Fermentas)

For work with RNA: Be aware of RNase! Use gloves, wash gloved hands with water, dry. Always use freshly autoclaved not yet opened pipet tips / Eppis! Treat pipets with RNase Erase spray!

In ein steriles, RNase und DNase-freies, 0,5 ml Eppendorf-Gefäß ("PCR-Tube") werden folgende Komponenten pipettiert:

- ° erforderliche RNA-Menge: bis 2 µg Gesamt-RNA oder 200 ng polyA⁺-RNA
- ° 1µl Glykogen
- ° 14 000 rpm 10 min RT
- ° Überstand entfernen
- ° 100 µl 70% EtOH
- ° 14 000rpm 10min. RT
- ° Überstand vollständig entfernen
- ° zu Pellet folgende Komponenten

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ - Primer (500µg / ml) *	1 µl	0,5 µg (Promega)
steriles Wasser	auf 11µl auffüllen	

Reaktionsansatz mischen und bei 72°C für 10 min. inkubieren.

Eppi sofort für 2 min auf Eis stellen und kurz abzentrifugieren.

Folgende Komponenten zugeben:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand Buffer- bei RT auftauen	4 µl	1x
0,1 M DTT bei RT auftauen	2 µl	
dNTP-Mix [5mM <small>each</small>]	2 µl	
RNase Inhibitor (RiboLock, Fermentas)	1 µl	40 Einheiten
Gesamtvolumen	19 µl	

Die Komponenten als Mastermix mischen, erneut kurz abzentrifugieren und anschließend zu den einzelnen Proben pipettieren; mix; vortex; short spin. 2 min. bei 42°C inkubieren. Zum Ansatz 1µl SuperScript II (200 Einheiten) geben, durch auf- und abpipettieren mischen und bei 42 °C inkubieren. Nach 50 min wird die Reaktion durch Inkubation bei 70°C für 15 min. gestoppt.

Die cDNA-Synthese ist damit abgeschlossen und die cDNA steht für die anschließenden Experimente (z.B. RT-PCR) zur Verfügung.

Am besten wird die cDNA sofort in der RT-PCR eingesetzt. Sie kann aber auch bei – 80° C für mehrere Monate gelagert werden.

Für die anschließende PCR cDNA auf 100 µl mit sterilem Wasser verdünnen. Davon werden 1-5 µl der Reaktion eingesetzt.

5 x First-Strand Buffer:

250 mM Tris-HCl pH 8,3 (20°C)

15 mM MgCl₂

375 mM KCl

Bemerkungen

* Alternativ können auch 50-250 ng RandomPrimer oder 2 pmol genspezifische Primer eingesetzt werden. Bei der Verwendung von RandomPrimer ist eine weitere Inkubation bei 25°C für 10 min. vor der 42°C Inkubation notwendig.