Retrotrascrizione mediante TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit

(cat 4366596)

- Note generali
Utilizzare eppendorf DNAsi/RNAsi free da 0.2 ml
Lavorare con puntali con il filtro
Mantenere RNA e reagenti sempre in ghiaccio
- **Procedura**
Preparare all'interno della eppendorf da 0.2 ml una mix (volume finale 10 ul) contenente:

Reagente	Concentrazione nella mix	Volume
H ₂ O nucleasi free	/	2 ul
RNA	/	2 ul
RT Primer per miR-210 5X	1x	2 ul
Volume finale	/	6 ul

Dopo aver aggiunto tutti i reagenti, puntare la pipetta a 6 ul e pipettare più volte in modo da mescolare bene. Mantenere la mix in ghiaccio fino al momento di inserire la provetta in thermal Cycler.

Incubare 30 minuti a 16°C.

Mettere i campioni in ghiaccio e aggiungere uno alla volta i seguenti reagenti:

Reagente	Concentrazione nella mix	Volume
Buffer 10X	1x	1 ul
dNTPs 10mM	1 mM	1 ul
Multiscribe 33 U/ul	3.3 U/ul	1 ul
Rnasi Inhibitor 15 U/ul	0.15 U/ul	1 ul
Volume finale nella eppendorf	/	10 ul

Il volume finale tiene conto dei 6 ul iniziali addizionati ai 4 ul di mix di RT.

Mettere in thermal cycler utilizzando il seguente programma:

- 30 min a 42°C la trascrittasi inversa sintetizza il cDNA a partire dallo stampo
- 5 min a 85°C inattivazione della trascrittasi inversa
- 4°C, ∞

Conservare il cDNA a -20°C