

一步法反转录试剂盒 (OneStep gDNA Removal)

KM405 100次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM405(100 次)
5*RT MasterMix	-20°C	400µl
gDNA Remover	-20°C	100µl
RNase free H ₂ O	-20°C	1ml*2

本试剂盒在 - 20°C 储存, 有效期 12 个月

产品介绍:

本试剂盒采用分子进化技术多点突变的新一代反转录酶, 大幅度提高了热稳定性和反转录效率。5 * RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix, 含有反转录所需的所有试剂 (script H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer), 只需加入模板 RNA 和水即可进行反应。特别适合cDNA合成以后的两步法 RealTime PCR检测。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover, 只需一步操作, 即可同时完成基因组清除与逆转录反应, 极大简化了操作步骤, 避免了复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。

产品特点:

1. 全预混的反转录 Mix, 只需一步同时加入 gDNA Remover、模板 RNA 和水, 实现 cDNA 合成和去除基因组 DNA 同时进行。15-30 分钟完成反转录。(荧光定量 15 分钟即可) 操作简便, 快捷。
2. RNA 模板的体积最多可加到总体积的 80%, 非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录反应。
3. 本产品针对 qPCR 进行特别优化 oligo dT 和 N6 随机引物配比, 使 cDNA 合成可从 RNA 转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率, 最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。

注意事项

1. 避免 RNase 污染, 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
2. 5*RT MasterMix 低温下可能有沉淀析出。使用前请还原至室温并轻摇混匀, 待沉淀重新溶解后使用。
3. 5* RT MasterMix 和 gDNA Remover 含甘油很粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。5 * RT MasterMix 和 gDNA Remover 内包含的酶均为过量, 即使每次 5*RT MasterMix 按照 3.6 μ l-3.8 μ l 使用, gDNA Remover 按照 0.8 μ l-0.9 μ l 也不影响使用效果。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

第一链 cDNA 合成 (以 20 μ l 反应体系为例, 也可以采用 10 μ l 反应体系)

1. 将模板 RNA、gDNA Remover、5 * RT MasterMix 在冰上解冻; RNase free H₂O 在室温 (15-25°C) 解冻, 解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀, 可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在 RNase free 管里面加入以下成分: (建议使用 PCR 管冰上配制, 置 PCR 仪反应)

组分	20 μ l 反应体系
Total RNA/mRNA	$\leq 15 \mu$ l
5* RT MasterMix	4 μ l (见注意事项 3)
gDNA Remover	1 μ l (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 20 μ l (补足到总体积 20 μ l)

注意: Total RNA 不超过 2 μ g, mRNA 不超过 200 ng (20 μ l 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀(总体积 20 μ l)

如使用 mRNA 模板是来源于真核细胞 (如人、小鼠的组织细胞) 含有 Poly(A) 尾结构, 42°C 孵育 15-30 min。

如使用 mRNA 模板是来源于原核细胞 (细菌) 或者病毒等不含 Poly(A) 尾结构, 25°C 孵育 10 min, 42°C 孵育

15-30 min。注意：如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至50°C-55°C（先在42°C孵育2分钟以清除基因组DNA），有助于提高产量。

4. 85°C加热5sec失活反转录酶和gDNA Remover。
5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20°C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。
6. RT-qPCR 取适量反转录cDNA产物（一般不超过qPCR反应体积的1/10）作为qPCR模板，按照厂家荧光定量PCR试剂说明书进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。