

第一链 cDNA 合成试剂盒(gDNA Removal)

KM406 100次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM406(100 次)
5*RT Reaction Mix	-20°C	400µl
gDNA Remover	-20°C	100µl
RNase free H2O	-20°C	1ml*2
Oligo(dT)(0.5 µg /µl)	-20°C	100µl
Random primer (N6)	-20°C	100µl

本试剂盒在 - 20°C 保存, 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具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建。采用预混合技术, 用 5*RT Reaction Mix (已经预混合了 script H⁻ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer) 高效合成第一链 cDNA, 操作简单。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. 新一代反转录酶大幅度提高了稳定性和反转录效率。合成 cDNA 长度高达 12 kb 以上。
2. 全预混的反转录 Mix, 只需加入 RNA、引物和水, 简单快速完成反转录。
3. gDNA Remover 采用先进的一步基因组清除技术, 最短时间最简单完成去除基因组 DNA 步骤。
4. RNA 模板的体积最多可加到总体积的 75%, 非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录反应。
5. 预混合 Mix 在-20°C 不冻结, 减少了化冻和混匀时间, 使用更简单。
6. 用户可根据需要, 可灵活选择 Oligo (dT)、Random primer 或基因特异引物作为逆转录引物。

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. 可选步骤 (一般不需要): 如果 RNA 模板 GC 含量丰富或者有复杂二级结构、或者扩增 cDNA 长度超过 3kb, 可以先只加 RNA 模板、引物和 RNase free H₂O 混匀, 65°C 变性 5 分钟, 冰上冷却, 短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
3. 5*RT Reaction Mix 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。
4. 5*RT Reaction Mix 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 Reaction Mix 内包含的酶均为过量, 即使每次按照 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。

引物选择:

1. 如果模板为真核生物来源, 一般情况下首选 Oligo (dT), 与真核生物 mRNA 的 3' Poly A 尾配对, 可获得最高产量的全长 cDNA。
2. 如果对一些物种, 不能确定 mRNA 是否有 polyA 尾的情况下, 首选 Oligo (dT), 不成功再尝试基因特异性引物(GSP)和 Random primer 为引物。
3. 基因特异性引物(GSP)的特异性最高。但有些情况下, 用于 PCR 反应的 GSP 无法有效引导第一链 cDNA 合成, 可改用 Oligo (dT)或 Random primer 重新进行逆转录。
4. Random primer 特异性最低, 所有 RNA, 包括 mRNA, rRNA, tRNA 均可以作为 Random primer 的模板。当目标区域具有复杂二级结构或 GC 含量较高, 或者模板为原核生物来源, 使用 Oligo (dT)或基因特异性引物(GSP)无法有效引导 cDNA 合成时, 可使用 Random primer 为引物。
5. 如果合成 cDNA 下游用于荧光定量 PCR, 可将 Oligo (dT)与 Random primer 混合使用 (各加 1 μ l/20 μ l 反应体系), 可使 mRNA 的各个区域 cDNA 合成效率相同, 有助于提高定量结果的真实性和重复性。

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 Reaction Mix 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	20μl 反应体系
Total RNA/mRNA	≤ 15 μl
5* RT MasterMix	4 μl (见注意事项 4)
gDNA Remover	1 μl (见注意事项 4)
Oligo(dT)(0.5 μg /μl) or Random Primer(0.1 μg/μl) or GSP(Gene Specific Primer, 2 pmol/μl)	1 μl
RNase free H ₂ O	to 20 μl (补足到总体积 20 μl)

下游实验为克隆基因时可不加gDNA Remover

3. 轻轻混匀, 如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP), 42°C孵育30-50 min (如产物用于qPCR, 42°C孵育15 min) 如用Random Primer, 25°C孵育10 min, 42°C孵育30-50 min (如产物用于qPCR, 42°C孵育15 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, 有助于提高产量。

4. 85°C加热5 sec失活反转录酶。

5. 得到的cDNA产物可立即用于PCR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。

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。