



All-in-One First-Strand Synthesis 一步法逆转录试剂盒

包装量:

目录编号	包装单位
GxRT005-50	20 μ l \times 50 次
GxRT005-100	20 μ l \times 100 次

Components	GxRT005-50	GxRT005-100
5 \times TRUE RT MasterMix	200 μ l	400 μ l
gDNA Remover	50 μ l	100 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml

产品储存: -20°C 保存, 有效期 12 个月

制品说明: 本制品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 \times TRUE RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix, 含有反转录所需的所有试剂 (TRUEscript 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。使得 cDNA 的合成更加的方便快捷, 特别适合 cDNA 合成以后的两步法 Real Time PCR 检测。通常 Real Time RT-PCR 等实验需要先用 DNase I 消化去除 RNA 中残留的基因组 DNA(gDNA), 但是传统 DNase I 处理复杂并容易造成 RNA 的降解和损失。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。

适用范围: 第一链 cDNA 合成。可用于高、低拷贝基因的检测。

产品特点:

1. 新一代反转录酶大幅度提高了热稳定性和反转录效率。
2. 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 分钟简单快速完成反转录。
3. 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。
4. 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。
5. 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。

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 \times TRUE 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)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 15 μl *
5 × TRUE RT MasterMix	4 μl (见注意事项 3)
gDNA Remover	1 μl (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 20 μl (补足到总体积 20 μl)

* Total RNA 不超过 2 μg, mRNA 不超过 200 ng (20 μl 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀(总体积 20μl)

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 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 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 5 sec 失活 TRUEscript H⁻ RTase 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。

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 (艾德莱货号: PC59) 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。

注意事项:

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 5 × TRUE 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, 使用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。5 × TRUE RT MasterMix 和 gDNA Remover 内包含的酶均为过量, 即使每次 5 × TRUE RT MasterMix 按照 3.6 μl-3.8 μl 使用, gDNA Remover 按照 0.8 μl-0.9 μl 也不影响使用效果。

官方网址: <http://www.genesion.com.cn>

订货热线: 4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

