

UltraScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit (OneStep gDNA Removal)

使用说明书

包装量:

目录编号	包装单位
RT317-01	50 次*20uL
RT317-02	100 次*20uL

Components	RT317-01	RT317-02
5× UltraScript RT MasterMix	200μL	400μL
gDNA Remover	50μL	100μL
RNase-free Water	1mL	1.5mL

产品储存: 4℃运输, -20℃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× UltraScript RT MasterMix为一管式反转录预混Mix, 含有反转录所需的所有试剂(UltraScript 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。可用于高拷贝、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。

- 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。
- 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。
- 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20μL反应体系为例，也可以采用10μL反应体系)

- 将模板RNA、gDNA Remover、5× UltraScript RT MasterMix在冰上解冻；RNase-free Water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。
- 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	≤ 15μL *
5× UltraScript RT MasterMix	4μL(见注意事项 3)
gDNA Remover	1μL(见注意事项 3)
RNase-free Water	to 20μL(补足到总体积 20μL)

■ Total RNA 不超过 2μg, mRNA 不超过 200ng(20μL 体系)

- 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。
- 85°C加热 5 sec 失活UltraScript H⁻ RTase和gDNA Remover。
- 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，按照爱普科学的AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix(With 100× ROX)说明书(货号：FP304)，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× UltraScript RT MasterMix和gDNA Remover含甘油比较粘稠，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× UltraScript RT MasterMix 和 gDNA Remover 内包含的酶均为过量，即使每次 5×UltraScript RT MasterMix按照3.6μL-3.8μL使用， gDNA Remover按照0.8μL-0.9μL使用，均不影响使用效果。

=====

