

NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA Purge)

目录号: E042

01/ 产品描述

第一链 cDNA 合成试剂盒(去基因组)是以 mRNA 或者总 RNA 为模板, 高效合成第一链 cDNA。本试剂盒使用 NovoScript® II Reverse Transcriptase 反转录酶 (Cat.No.: E126), 它是对 M-MuLV (RNase H-) 进行基因工程改造, 表达并纯化的高温逆转录酶, 比 M-MuLV (RNase H-) 提高了热稳定性。该酶可以在高温条件下 (50~60℃) 进行 cDNA 第一链的合成, 高温条件下有利于打开复杂 RNA 模板链。该酶最佳反应温度为 50℃, 具有热稳定相强, 灵敏度高, 特异性高, 聚合能力强等优点。

试剂盒中含有重组 RNase Inhibitor (Cat.No.: E125), 可耐受 55℃ 高温, 有效防止 RNA 降解。本制品含有去基因组成分 gDNA Purge, 以 RNA 为模板进行 cDNA 第一链合成时, 可以同步去除基因组 DNA 污染, 反应结束后, 70℃ 加热 5 分钟, 就可以失活 NovoScript® II Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、gDNA Purge。

02/ 产品用途

- 1) NovoScript® II Reverse Transcriptase 无 RNase H 活性, 可避免第一链 cDNA 合成过程中, RNA/DNA 杂交模板链中 RNA 降解, 保证 cDNA 合成的质量。
- 2) 试剂盒中含去基因组成分, 反转录时可同步去除基因组 DNA 污染。
- 3) RT-PCR 反应以及 Real Time RT-PCR 反应。

03/ 保存温度

-20℃。

04/ 产品包装

产品组成	E042-01A (50 Rxns)	E042-01B (100 Rxns)
NovoScript® II Reverse Transcriptase (200U/μl)	50μl	100μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	50μl	100μl
gDNA Purge	50μl	100μl
5×NovoScript® RT Buffer	1ml	1ml×2
dNTPs (10mM each)	200μl	400μl
Oligo(dT) ₁₈ (100μM)	100μl	200μl
Random N6 (100μM)	100μl	200μl
RNase Free Water	1ml	1ml×2

05/ 注意事项

- 1) 产品反应 Buffer 中含有 DTT, 低温下或者冻融可能会导致其析出, 请恢复至室温并混匀后使用。
- 2) 用 DEPC 处理实验用到的所有实验器材, 或购买已经证明无核酸酶的实验用具, 实验过程戴手套并经常更换手套, 避免 RNA 酶的污染, 确保所用其他试剂中无 RNA 酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中, 所有管子确保扣严。
- 4) 纯化过的 RNA 必须保证不含有盐, 金属离子, 乙醇和苯酚, 以上成分会干扰第一链 cDNA 合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除掉痕量污染物。
- 5) 为保证反转录反应有效进行, 需使用高质量的 RNA 模板。
- 6) 当模板含量较低或后续 PCR 扩增片段过长时可以适当延长逆转录时间。

仅供科研或生产使用, 不可直接应用于人体

近岸蛋白

Novoprotein Scientific Inc.

技术咨询电话: 400-600-0940; (021)5079-8060

官方网站: www.novoprotein.com.cn

邮箱: product@novoprotein.com.cn

地址: 上海市浦东新区张江高科技园区伽利略路11号1号楼

06/ 操作说明

I.第一链 cDNA 合成

试剂融化后，将试剂盒中各组分混匀并稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物：

模板 RNA	总 RNA (0.1 ng -5μg)
	poly(A) mRNA (10pg)
	特异性 RNA (0.01pg)
引物	Oligo (dT) ₁₈ 1μl
	Random N6 1μl
	基因特异性引物 15-20pmol
5×NovoScript® RT Buffer	4μl
RNase Inhibitor	1μl
gDNA Purge	1μl
dNTPs (10mM each)	2μl
NovoScript® II Reverse Transcriptase	1μl
RNase Free Water	至 20μl

注：如果 RNA 浓度低或者为了提高灵敏度，可先将 RNA 中加入 gDNA Purge。42℃消化 5min，70℃加热 5min 终止反应。再配制逆转录体系（不含 gDNA Purge）进行反应。

2) 可选优化步骤：如果 RNA 模板 GC 含量高或含有二级结构，可先将模板与引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65℃孵育 5min，冰上冷却。

3) 轻轻混匀，离心。

4) 如果使用 Oligo(dT)₁₈ 或者基因特异型引物，50℃孵育 15-30min；使用随机六聚体引物时，25℃先孵育 5min，随后 50℃孵育 15-30min；

5) 70℃加热 5min，终止反应。

*反应产物可直接用于 PCR 反应，如果不立即使用，-20℃保存少于一周的时间。长时间保存建议-70℃放置。

II.第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

常用反应体系（50μl）：

2×Taq Master Mix*	25μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
模板	1-2μl
ddH ₂ O	至 50μl

常用 PCR 循环：

94℃，	1 分钟 30 秒
30 次循环：	94℃， 20 秒 57℃， 20 秒 72℃， 1kb/60 秒
72℃	5 分钟
4℃	保温