

NovoScript® Plus one-step 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge)

目录号: E147

产品描述:

第一链cDNA合成预混液是以mRNA或者总RNA为模板, 高效合成第一链cDNA。本产品含有反转录反应所需的全部试剂 (NovoScript® II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Oligo(dT)₁₈, Random N6, dNTPs)。反应时只需要加入RNA模板和水即可, 操作简单, 降低操作过程中的污染。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, 85°C加热5秒, 就可以失活反转录酶, RNA酶抑制剂。合成的第一链cDNA能直接用于PCR或荧光定量PCR的模板, 第二链cDNA的合成或线性RNA扩增, 也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验。

产品特点:

- 本制品采用耐高温逆转录酶, 大幅提高热稳定性和cDNA合成效率;
- 本制品中添加的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;
- 本制品中Random N6和Oligo(dT)₁₈引物比例经过优化, 可均匀合成样品中的cDNA;
- 本制品中含有去基因组成分, 反转录时可同步去除基因组DNA污染。

保存温度: -20°C。

产品包装:

产品组成	A 包装	B 包装
2×NovoScript® Plus one-step 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	500µl	1ml
gDNA Purge	50µl	100µl
RNase Free Water	1ml	1ml×2

注意事项:

- 1) 用DEPC处理实验用到的所有实验器材, 或者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。
- 2) 确保所用试剂中无RNA酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中, 所有管子要确保扣严。
- 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的合成反应。可采用乙醇沉淀RNA的方法去除掉痕量污染物。
- 5) 为保证反转录反应的有效进行, 需使用高质量的RNA模板。
- 6) 实验结果显示, 最快逆转录速度可达2kb/min, 需要提高反转录效率或模板含量较低时可以适当延长反转录时间。

操作方法:

I. 第一链 cDNA 合成

试剂融化后, 各组分混匀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 -1 μ g)
	mRNA(\geq 10 pg)
	特异性 RNA(\geq 0.01 pg)
gDNA Purge	1 μ l
2 \times NovoScript [®] Plus one-step 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	10 μ l
RNase Free Water	至 20 μ l

轻轻混匀, 离心。

2) 反应程序:

37 $^{\circ}$ C, 5min	去除 gDNA
50 $^{\circ}$ C, 15-30min	cDNA 合成
85 $^{\circ}$ C, 5sec	终止反应

反应产物可直接用于 PCR, 如果不立即使用, -20 $^{\circ}$ C 保存, 长时间保存建议-70 $^{\circ}$ C 放置。

注:

- 1、如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构, 可先将 RNA 模板和 RNase Free Water 混匀后, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 冰上冷却, 然后再加入其它组分进行反应。

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 (50 μ l):

2 \times Taq Master Mix*	25 μ l
上游引物	0.2-1.0 μ M (终浓度)
下游引物	0.2-1.0 μ M (终浓度)
模板	1-2 μ l
ddH ₂ O	至 50 μ l

*Mg²⁺终浓度为 2mM

常用 PCR 循环:

94 $^{\circ}$ C,	1 分 30 秒
30 次循环:	94 $^{\circ}$ C, 20 秒
	57 $^{\circ}$ C, 20 秒
	72 $^{\circ}$ C, 1kb/60 秒
72 $^{\circ}$ C	5 分钟
4 $^{\circ}$ C	保温