

ExonScript® First-Strand Synthesis SuperMix with dsDNase

货号：A503

保存：-20℃保存两年

货号	规格
A503-01	20 μ l×50 rxns
A503-02	20 μ l×100 rxns

【产品概述】

ExonScript First-Strand Synthesis SuperMix with dsDNase是将RNA逆转录成为cDNA更为简便的操作系统，含有第一链cDNA合成所需的所有试剂，只需加入RNA模板和水即可进行逆转录反应。合成的第一链cDNA可广泛用于文库构建、第二链合成、杂交、PCR扩增、RT-qPCR检测等。试剂盒中包含新一代的逆转录酶和优化的缓冲液，与普通逆转录酶系统相比，具有逆转录能力强（合成较多全长cDNA）、无RNase H活性、热稳定性高和半衰期长等优点。该逆转录酶产物得率更高，获得的cDNA片段更长，模板使用范围更广等特点。5×Reaction Mix包含逆转录反应所需的缓冲液、dNTPs，Supreme Enzyme Mix包含ExonScript Reverse Transcriptase，Ribonuclease Inhibitor和dsDNase，以简化加样步骤。试剂盒中含有的新型dsDNase，能够特异性去除双链DNA，而不消化RNA样品、逆转录引物及合成的cDNA，并且具有热敏感性，可在55℃快速不可逆失活，实现去除基因组污染与逆转录反应的同步进行。试剂盒中包含单组分逆转录引物Oligo(dT)₂₀和Random Hexamers，用户可根据需要，灵活选择逆转录引物进行后续实验。

- 高热稳定性，反应温度42-55℃，有助于RNA二级结构打开
- 逆转录能力强、cDNA合成得率高，片段更长
- 无RNase H活性，避免第一链cDNA合成过程中DNA/RNA杂交体中模板RNA被降解，从而保证第一链cDNA合成量和长度
- 去除基因组DNA，保证定量结果更加准确
- 单组分逆转录引物，选择更为灵活
- 合成片段≤15 kb

【适用范围】

- cDNA合成及文库构建
- PCR扩增
- RT-qPCR检测

【产品组成】

Component	A503-01	A503-02
5×Reaction Mix ^{*1}	200 μ l	400 μ l
Oligo(dT) ₂₀ Primer (100 μ M)	50 μ l	100 μ l
Random Hexamer Primer (100 μ M)	50 μ l	100 μ l
Supreme Enzyme Mix ^{*2}	150 μ l	300 μ l
DEPC-treated Water	1 ml	2×1 ml

*1: 包含Buffer、dNTPs。

*2: 包含ExonScript Reverse Transcriptase、Ribonuclease Inhibitor和dsDNase。

【第一链cDNA合成】

Step	Action								
 1 RNA变性/引物退火	a. 在PCR管中加入以下成分 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th><th>Volume</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10 pg-5 μg Total RNA or 1 pg-500 ng mRNA ^{*3}</td><td>As Required</td></tr> <tr> <td>100 μM Oligo(dT)₂₀ Primer, 100 μM Random Hexamer Primer or 10 μM Gene-specific Reverse Primer</td><td>1 μl</td></tr> <tr> <td>DEPC-treated Water</td><td>up to 13 μl</td></tr> </tbody> </table> b. 轻轻混匀并瞬离以上成分 c. 以上成分在65℃处理5 min，立即置于冰上放置至少2 min	Component	Volume	10 pg-5 μ g Total RNA or 1 pg-500 ng mRNA ^{*3}	As Required	100 μ M Oligo(dT) ₂₀ Primer, 100 μ M Random Hexamer Primer or 10 μ M Gene-specific Reverse Primer	1 μ l	DEPC-treated Water	up to 13 μ l
Component	Volume								
10 pg-5 μ g Total RNA or 1 pg-500 ng mRNA ^{*3}	As Required								
100 μ M Oligo(dT) ₂₀ Primer, 100 μ M Random Hexamer Primer or 10 μ M Gene-specific Reverse Primer	1 μ l								
DEPC-treated Water	up to 13 μ l								
 2 逆转录体系配制	d. 按顺序添加以下成分到RNA-primer Mix中 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th><th>Volume</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RNA-primer Mix</td><td>13 μl</td></tr> <tr> <td>5×Reaction Mix ^{*4}</td><td>4 μl</td></tr> <tr> <td>Supreme Enzyme Mix</td><td>3 μl</td></tr> </tbody> </table> e. 轻轻混匀并瞬离以上成分	Component	Volume	RNA-primer Mix	13 μ l	5×Reaction Mix ^{*4}	4 μ l	Supreme Enzyme Mix	3 μ l
Component	Volume								
RNA-primer Mix	13 μ l								
5×Reaction Mix ^{*4}	4 μ l								
Supreme Enzyme Mix	3 μ l								
 3 逆转录反应	f. 如含有Random Hexamer Primer，25℃孵育10 min，进入步骤 g；如用Oligo(dT)₂₀ Primer或Gene-specific Reverse Primer，直接进入步骤 g g. 逆转录体系在55℃孵育15 min，对于高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板，可以选择55℃孵育30 min h. 85℃加热5 min灭活ExonScript Reverse Transcriptase								

*3: 为保证逆转录成功, 请使用高质量的RNA模板。

*4: 5×Reaction Mix在使用前需充分混匀。

- 产物可立即用于PCR或qPCR反应, 或在-20℃保存, 并在半年内使用; 长期存放建议分装后在-70℃保存。cDNA应避免反复冻融。
- 推荐产物cDNA用无菌去离子水稀释5~10倍后使用。

【注意事项】

防止RNase污染

- 请保持实验区域洁净; 操作时需穿戴干净的手套、口罩; 实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证RNase-free。

引物选择

- 如果模板为真核生物来源, 一般情况下首选Oligo(dT)引物, 与真核生物mRNA的3' Poly(A) 尾配对, 可获得最高产量的全长cDNA。由于Oligo(dT)引物对Poly(A)尾部的特异性, 它们不适用于降解的RNA, 也不适用于缺少Poly(A)尾部的RNA, 如原核RNA和microRNA。
- Random Hexamer Primer由6个核苷酸组成, 又称为随机六聚体。由于随机引物没有模板特异性, 其可以退火到样品中的任何RNA种类。增加逆转录反应中的随机六聚体浓度, 可提高cDNA产量, 但同时也会增加相同模板上多个位点的结合, 从而导致cDNA片段较短。因此, 两步法RT-PCR经常使用Oligo(dT)引物和随机引物的混合物, 从而保障所有引物类型的效果。在此条件下, 加入100 μM Oligo(dT)₂₀ Primer和100 μM Random Hexamer Primer各0.5 μl进行逆转录反应。
- Gene-specific Reverse Primer (GSP)特异性最高, 但有些情况下, 用于PCR反应的GSP无法有效合成第一链cDNA, 这时可以改用Oligo (dT)₂₀或Random Hexamer Primer重新进行逆转录。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任, 仅限于此产品的价值本身。



■ 蓉为基因/Exongen Biotech Co., Ltd
■ 咨询热线/400-0800-717
■ 技术支持/support@exongen.com

■ 网址/www.exongen.com
■ 销售/sales@exongen.com
■ 售后/service@exongen.com