

## ExonScript<sup>®</sup> Plus First-Strand Synthesis System

货号：A511

保存：-20℃保存两年

| 货号      | 规格            |
|---------|---------------|
| A511-01 | 20 μl×20 rxns |
| A511-02 | 20 μl×50 rxns |

### 【产品概述】

本产品为包含逆转录延伸因子的新一代逆转录酶，以及针对逆转录优化的最适缓冲液系统，进一步提高cDNA合成的效率及长度。ExonScript Plus Reverse Transcriptase是通过基因改造，在大肠杆菌中表达纯化得到的耐高温逆转录酶，无RNase H活性。该酶可在45-60℃条件下合成cDNA的第一条链，最佳反应温度55℃。与其他逆转录酶系统相比，具有更强的逆转录延伸能力（合成较多全长cDNA）、热稳定性，以及抑制剂耐受能力。特别适用于长转录本、复杂二级结构，以及含有抑制剂的RNA样品逆转录反应。

- 逆转录延伸能力强，可快速获得大量长片段cDNA
- 高热稳定性，反应温度45-60℃，有助于RNA二级结构打开
- 抑制剂耐受能力强，合成cDNA更稳定
- 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
- 合成片段≥15 kb

### 【适用范围】

- 长片段cDNA合成及文库构建
- RNA测序和长片段cDNA测序
- PCR扩增
- 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板

## 【产品组成】

| Component                                             | A511-01      | A511-02      |
|-------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| ExonScript Plus Enzyme Mix <sup>*1</sup>              | 20 $\mu$ l   | 50 $\mu$ l   |
| 5 $\times$ ExonScript Plus RT Buffer <sup>*2</sup>    | 400 $\mu$ l  | 1000 $\mu$ l |
| Anchored Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer (100 $\mu$ M) | 20 $\mu$ l   | 50 $\mu$ l   |
| Random Hexamer Primer (100 $\mu$ M)                   | 20 $\mu$ l   | 50 $\mu$ l   |
| DEPC-treated Water                                    | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l |

\*1: 包含ExonScript Plus Reverse Transcriptase和Ribonuclease Inhibitor。

\*2: 包含Buffer和dNTPs。

## 【第一链cDNA合成】

| Step                                                                                                                              | Action                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|-------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------|------------------|
|                                                  | <p><b>RNA变性/引物退火</b></p> <p>a. 在PCR管中加入以下成分</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th><th>Volume</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 ng-1 <math>\mu</math>g Total RNA or 50 pg-100 ng mRNA <sup>*3</sup></td><td>As Required</td></tr> <tr> <td>100 <math>\mu</math>M Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer, 100 <math>\mu</math>M Random Hexamer Primer or 10 <math>\mu</math>M Gene-specific Reverse Primer</td><td>1 <math>\mu</math>l</td></tr> <tr> <td>DEPC-treated Water</td><td>up to 15 <math>\mu</math>l</td></tr> </tbody> </table> <p>b. 轻轻混匀并瞬离以上成分</p> <p>c. 以上成分在65<math>^{\circ}</math>C处理5 min, 立即置于冰上放置至少2 min</p> | Component | Volume | 1 ng-1 $\mu$ g Total RNA or 50 pg-100 ng mRNA <sup>*3</sup> | As Required | 100 $\mu$ M Anchored Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer, 100 $\mu$ M Random Hexamer Primer or 10 $\mu$ M Gene-specific Reverse Primer | 1 $\mu$ l | DEPC-treated Water         | up to 15 $\mu$ l |
| Component                                                                                                                         | Volume                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| 1 ng-1 $\mu$ g Total RNA or 50 pg-100 ng mRNA <sup>*3</sup>                                                                       | As Required                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| 100 $\mu$ M Anchored Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer, 100 $\mu$ M Random Hexamer Primer or 10 $\mu$ M Gene-specific Reverse Primer | 1 $\mu$ l                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| DEPC-treated Water                                                                                                                | up to 15 $\mu$ l                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
|                                                | <p><b>逆转录体系配制</b></p> <p>d. 按顺序添加以下成分到RNA-primer Mix中</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th><th>Volume</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RNA-primer Mix</td><td>15 <math>\mu</math>l</td></tr> <tr> <td>5<math>\times</math>ExonScript Plus RT Buffer <sup>*4</sup></td><td>4 <math>\mu</math>l</td></tr> <tr> <td>ExonScript Plus Enzyme Mix</td><td>1 <math>\mu</math>l</td></tr> </tbody> </table> <p>e. 轻轻混匀并瞬离以上成分</p>                                                                                                                                                                                                       | Component | Volume | RNA-primer Mix                                              | 15 $\mu$ l  | 5 $\times$ ExonScript Plus RT Buffer <sup>*4</sup>                                                                                | 4 $\mu$ l | ExonScript Plus Enzyme Mix | 1 $\mu$ l        |
| Component                                                                                                                         | Volume                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| RNA-primer Mix                                                                                                                    | 15 $\mu$ l                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| 5 $\times$ ExonScript Plus RT Buffer <sup>*4</sup>                                                                                | 4 $\mu$ l                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
| ExonScript Plus Enzyme Mix                                                                                                        | 1 $\mu$ l                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |
|                                                | <p><b>逆转录反应</b></p> <p>f. 如含有Random Hexamer Primer, 25<math>^{\circ}</math>C孵育10 min, 进入步骤 g; 如用Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer或Gene-specific Reverse Primer, 直接进入步骤 g</p> <p>g. 逆转录体系在55<math>^{\circ}</math>C孵育30 min</p> <p>h. 85<math>^{\circ}</math>C加热5 min灭活ExonScript Plus Reverse Transcriptase</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |        |                                                             |             |                                                                                                                                   |           |                            |                  |

\*3: 为保证逆转录成功, 请使用高质量的RNA模板。

\*4: 5×ExonScript Plus RT Buffer含有逆转录增强剂, 冻存过程中可能产生沉淀, 在使用前需充分溶解混匀。

- 产物可立即用于PCR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Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>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Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>引物与Poly(A)尾部配对, 因此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Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>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 Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub> 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Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>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