

ExonScript[®] First-Strand Synthesis System

货号: A501-01

保存: -20°C保存两年

浓度: 200 U/μl

【产品概述】

本产品包含新一代的逆转录酶和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。ExonScript 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42-55°C条件下合成cDNA的第一条链, 最佳反应温度50°C。与普通逆转录酶系统相比, 具有特异性高、逆转录能力强(合成较多全长cDNA)、热稳定性高和半衰期长等优点。

- 高热稳定性, 反应温度42-55°C, 有助于RNA二级结构打开
- 特异性高、逆转录能力强、cDNA合成得率高
- 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】

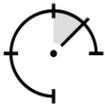
- cDNA合成及文库构建, 5' 和 3' RACE
- 不同拷贝基因检测
- 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板

【产品组成】

Component	A501-01
ExonScript Reverse Transcriptase (200 U/μl)	100 μl
5×ExonScript RT Buffer	500 μl
100 mM DTT	120 μl
Oligo(dT) ₂₀ Primer (100 μM)	120 μl
Random Hexamer Primer (100 μM)	120 μl

10 mM dNTP Mix	120 μ l
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	100 μ l
DEPC-treated Water	1000 μ l

【第一链cDNA合成】

Step		Action												
1	 RNA变性/引物退火	<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>10 pg-5 μg Total RNA or 10 pg-500 ng mRNA¹</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>10 mM dNTP Mix (10 mM each)</td> <td>1 μl</td> </tr> <tr> <td>DEPC-treated Water</td> <td>up to 13 μl</td> </tr> </tbody> </table> <p>b. 轻轻混匀并瞬离以上成分 c. 以上成分在65°C处理5 min, 立即置于冰上放置至少2 min</p>	Component	Volume	10 pg-5 μ g Total RNA or 10 pg-500 ng mRNA ¹	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	10 mM dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l	DEPC-treated Water	up to 13 μ l		
Component	Volume													
10 pg-5 μ g Total RNA or 10 pg-500 ng mRNA ¹	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													
10 mM dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l													
DEPC-treated Water	up to 13 μ l													
2	 逆转录体系配制	<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>13 μl</td> </tr> <tr> <td>5\timesExonScript RT Buffer²</td> <td>4 μl</td> </tr> <tr> <td>100mM DTT</td> <td>1 μl</td> </tr> <tr> <td>Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)</td> <td>1 μl</td> </tr> <tr> <td>ExonScript Reverse Transcriptase (200 U/μl)</td> <td>1 μl</td> </tr> </tbody> </table> <p>e. 轻轻混匀并瞬离以上成分</p>	Component	Volume	RNA-primer Mix	13 μ l	5 \times ExonScript RT Buffer ²	4 μ l	100mM DTT	1 μ l	Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	ExonScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l
Component	Volume													
RNA-primer Mix	13 μ l													
5 \times ExonScript RT Buffer ²	4 μ l													
100mM DTT	1 μ l													
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l													
ExonScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l													
3	 逆转录反应	<p>f. 如用Random Hexamer Primer, 25°C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50°C孵育30 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°C孵育30 min h. 80°C加热10 min灭活ExonScript Reverse Transcriptase</p>												

1. 为保证逆转录成功，请使用高质量的RNA模板。

2. 5×ExonScript RT Buffer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。

【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。
- 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。



■ 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