

HotScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit (With SuperMix)

使用说明书

包装量:

| 目录编号 | 包装单位 |
|----------|------------------|
| RT314-01 | 50 次*20 μ L |
| RT314-02 | 100 次*20 μ L |

| Components | RT314-01 | RT314-02 |
|-----------------------------------|-------------|----------------|
| 5 \times HotScript RT MasterMix | 200 μ L | 400 μ L |
| RNase-free Water | 1mL | 2 \times 1mL |

产品储存: 4 $^{\circ}$ C 运输, -20 $^{\circ}$ C 保存, 有效期 12 个月。

制品说明: 本制品采用分子进化技术高达 60 $^{\circ}$ C 的全新高温反转录酶, 可以通读 GC 含量丰富, 二级结构复杂的 RNA 模板, 极大提高反转录效率。5 \times HotScript RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix, 含有反转录所需的所有试剂(HotScript H⁺ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo(dT) Primer、dNTP Mixture、Buffer), 只需加入模板 RNA 和水即可进行反应。使得 cDNA 的合成更加的方便快捷, 特别适合 cDNA 合成以后的两步法 Real Time PCR 检测。

适用范围: 第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测, 尤其GC含量高, 复杂模板的高温反转录。

产品特点:

1. 新一代高温反转录酶极大提高包括复杂RNA模板的反转录效率, CT值一般提早2-3个循环。
2. 全预混的反转录Mix, 只需加入RNA和水, 15分钟简单快速完成反转录。
3. 预混合Mix在-20 $^{\circ}$ C不冻结, 减少了化冻和混匀时间, 使用更简单便捷。
4. RNA模板的体积最多可加到总体积的80%, 非常适合于低浓度RNA模板的逆转录反应。

5. 本产品针对qPCR进行特别优化oligo(dT)和N6随机引物配比,使cDNA合成可从RNA转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率,最大程度保证了qPCR结果的真实性和可重复性。

第一链cDNA合成: (以20μL反应体系为例, 也可以采用10μL反应体系)

1. 将模板RNA和5× HotScript RT MasterMix在冰上解冻; RNase-free Water在室温(15-25°C)解冻,解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀,可简短离心收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在RNase-free管里面加入以下成分: (建议使用PCR管冰上配制,置PCR仪反应)

| Components | Volume |
|---------------------------|----------------------|
| Total RNA/mRNA | ≤ 16μL * |
| 5× HotScript RT MasterMix | 4μL(见注意事项 3) |
| RNase-free Water | to 20μL(补足到总体积 20μL) |

■ Total RNA不超过2μg, mRNA不超过200ng(20μL体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀(总体积20μL), 25°C孵育10 min, 50°C孵育15 min。
注意: 本制品在42°C-60°C反转录均有稳定良好效果。如果模板具有复杂二级结构或高GC区域,可尝试将反应温度提高至55°C-60°C,有助于提高产量。
4. 85°C加热 5 sec 失活HotScript H⁺ RTase。
5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应,或在-20°C保存,并在半年内使用;长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

RT-qPCR: 取适量反转录cDNA产物(一般不超过qPCR反应体积的1/10)作为qPCR模板,按照厂家荧光定量PCR试剂说明书进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富,可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。

注意事项:

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. 5× HotScript RT MasterMix 非常粘稠,溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失,使用前请点甩离心后使用,并且避免吸头外壁沾附损失。5× HotScript RT MasterMix内包含的酶均为过量,即使每次按照3.6μL-3.8μL使用,也不影响使用效果。

=====

