

TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AT301

保存: -20°C保存两年。

产品说明

本产品以RNA为模板, 用TransScript® RT/RI Enzyme Mix、2×TS Reaction Mix, 高效合成第一链cDNA, 操作简便, 降低了操作过程中的污染机率。

特点

- TransScript® RT无RNaseH活性, 避免了第一链cDNA合成反应中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。
- 产物用于qPCR: 反转录15分钟; 产物用于PCR: 反转录30分钟。
- Anchored Oligo(dT)₁₈设计独特, 能锚定紧邻mRNA Poly(A)⁺的5'端的第一个碱基, 结合位点锚定, 特异性高, 保证第一链cDNA合成效率和成功率。
- 可用Random Primer(N9) 或基因特异引物 (GSP) 合成第一链cDNA。
- 合成片段≤12 kb。

适用范围

高拷贝、低拷贝基因检测。

试剂盒组成

| Component | AT301-02 | AT301-03 |
|---|----------|----------|
| TransScript® RT/RI Enzyme Mix | 50 µl | 100 µl |
| 2×TS Reaction Mix | 500 µl | 1 ml |
| Random Primer(N9) (0.1 µg/µl) | 50 µl | 100 µl |
| Anchored Oligo(dT) ₁₈ Primer (0.5 µg/µl) | 50 µl | 100 µl |
| RNase-free Water | 500 µl | 1 ml |

使用前, 请将各组点甩离心

第一链cDNA合成

1、加入

| Component | Volume |
|---|--------------------------|
| Total RNA/mRNA | 0.1 ng-5 µg/10 pg-500 ng |
| Anchored Oligo(dT) ₁₈ (0.5 µg /µl) | 1 µl |
| or Random Primer(N9) (0.1 µg/µl) | 1 µl |
| or GSP | 2 pmol |
| 2×TS Reaction Mix | 10 µl |
| TransScript® RT/RI Enzyme Mix | 1 µl |
| RNase-free Water | Variable |
| Total volume | 20 µl |

2、轻轻混匀

- 如用Anchored Oligo(dT)₁₈ 或基因特异引物 (GSP), 产物用于qPCR: 42°C孵育15分钟; 产物用于PCR: 42°C孵育30分钟。
- 如用Random Primer (N9), 25°C孵育10分钟后, 产物用于qPCR: 42°C孵育15分钟; 产物用于PCR: 42°C孵育30分钟。



3、85°C加热5秒钟失活*TransScript*[®] RT/RI。

推荐qPCR体系与条件 (以20 μl 反应体系为例)

| Component | Volume | Final Concentration |
|---|----------|---------------------|
| Template | Variable | as required |
| Forward Primer (10 μM) | 0.4 μl | 0.2 μM |
| Reverse Primer (10 μM) | 0.4 μl | 0.2 μM |
| 2× <i>TransStart</i> [®] Top/Tip Green qPCR SuperMix | 10 μl | 1× |
| Passive Reference Dye (50×) (optional) | 0.4 μl | 1× |
| Nuclease-free Water | Variable | - |
| Total volume | 20 μl | - |

qPCR (三步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 50-60°C 15 sec ★
 72°C 10 sec ★

40-45 cycles

qPCR (两步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 60°C 30 sec ★

40-45 cycles
 Dissociation Stage

Dissociation Stage

对于ABI仪器，荧光信号采集步骤 (三步法中可以是退火或是延伸步骤) 的时间如下

- ★使用ABI Prism7700/7900时，采集时间设定为30秒；
- ★使用ABI Prism7000/7300时，采集时间设定为31秒；
- ★使用ABI Prism7500时，采集时间设定为34秒；
- ★使用ABI ViiA 7时，采集时间设定为至少19秒。

高扩增效率选择三步法。高特异性选择两步法。

推荐PCR体系与条件 (以50 μl 反应体系为例)

| Component | Volume | Final Concentration |
|--|----------|---------------------|
| Template | Variable | as required |
| Forward Primer (10 μM) | 1 μl | 0.2 μM |
| Reverse Primer (10 μM) | 1 μl | 0.2 μM |
| 2× <i>TransTaq</i> [®] HiFi PCR SuperMix II | 25 μl | 1× |
| Nuclease-free Water | Variable | - |
| Total volume | 50 μl | - |

PCR

94°C 2-5 min
 94°C 30 sec
 50-60°C 30 sec
 72°C 1-2 kb/min
 72°C 5-10 min

35-40 cycles

注意事项

- 避免RNase污染。
- 为了保证反转录成功，请使用高质量的RNA模板。
- 对于复杂RNA模板，或为了获得更高的合成效率，建议将RNA模板、引物与RNase-free Water混匀，65°C孵育5分钟后，冰浴2分钟，然后再加入其它反应组分。
- 一步混匀所有的反应组分可以成功完成大多数反转录反应。对于复杂RNA模板，或为了获得更高的合成效率，建议按照说明书增加模板与引物的热孵育步骤。
- 产物用于qPCR时，对于某些特殊基因，为获得更好扩增效果，可适当延长42°C孵育时间为30分钟。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com.cn

