

描述: 本试剂盒采用稳定高效的反转录预混体系 5xGolden RT MasterMix 进行 RNA 的反转录反应, 使用时只需加入模板、引物和 RNase Free H₂O 即可, 大大简化了操作过程、提高了效率、减少了操作过程中的人为误差。MasterMix 中添加了 HL dsDNase (热敏双链特异性核酸酶), 该双链特异性核酸酶 (又名 gDNA Remover) 可在反转录的过程中, 直接降解去除 RNA 中残留的基因组 DNA 污染(可去除 100ng 基因组 DNA), 从而在定量 PCR 的检测中无需考虑基因组污染的干扰, 设计的定量 PCR 引物也无需进行横跨外显子。该试剂盒尤其适用于定量 PCR 检测。

该预混体系包含点突变致 RNase H 活性缺失的 Golden MLV Reverse Transcriptase 反转录酶、dNTP、反应 Buffer、HL dsDNase 和 RNase Inhibitor。该试剂盒采用的反转录酶去除了 RNase H 活性, 从而避免反转录过程中降解 RNA。同时经过突变文库筛选, 使得其热稳定性更强, 可耐受 55°C 高温反应。相比于低温条件下反转录反应, 采用高温反转录可显著打开 RNA 二级结构, 从而提高复杂 RNA 模板的扩增性能、提高反转录 cDNA 的长度和产量, 从而提高后续检测的灵敏度。合成的第一链 cDNA 可广泛用于 2nd Strand 的合成、杂交、PCR 扩增、Real-Time PCR 反应等。

应用:

- ① 该制品可有效反转录 mRNA、tRNA、LncRNA、ncRNA
- ② 该制品不可反转录 microRNA、病毒 DNA/RNA 样品

组分

| 名称 | 100T |
|---|-----------------|
| 5xGolden RT MasterMix (with dsDNase) | 400 μ l |
| 20xOligo dT(25)&Random Primer | 100 μ l |
| RNase Free H ₂ O | 1 ml \times 2 |

储存: 请置于-20°C, 可保存 3 年; 避免反复冻融。

注: 如 5xGolden RT MasterMix (with dsDNase) 出现沉淀属正常现象, 可用手捂化, 混合均匀后使用不影响实验结果。

1. 按以下组分配制反转录反应液

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| Total RNA or Poly(A) RNA | 0.1-2 μ g |
| 5xGolden RT MasterMix(with dsDNase) | 4 μ l |
| *20xOligo dT(25)&Random Primer | 1 μ l |
| Rnase Free H ₂ O | Up to 20 μ l |

*注: 反转录引物可根据需要改用特异性引物。

2. 根据实际情况反转录可选择快速程序或标准程序

快速程序

| | |
|------|--------------------|
| 37°C | 15~30min (cDNA 合成) |
| 85°C | 5min (失活 MLV) |

标准程序

| | |
|------|--------------------|
| 25°C | 10min (引物配对) |
| 55°C | 30~60min (cDNA 合成) |
| 85°C | 5min (失活 MLV) |

注: 通常在定量 PCR 实验中使用快速程序进行反转录 (反转录效率>80%), 在进行高 GC 含量、含复杂二级结构、长片段的模板转录时采用标准程序 (反转录效率>100%)。