

Goldenstar® RT6 cDNA Synthesis Kit

■ 目录号

TSK301S

TSK301M

■ 产品简介

本产品是专为两步法RT-PCR第一步cDNA第一链合成开发的试剂盒,它包含以RNA为模板合成cDNA所需的所有试剂。

产品中的Goldenstar® RT6逆转录酶由改造的莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV RT)经体外大肠杆菌重组表达而来。野生型M-MLV RT在分子生物实验中有两个明显的缺点:(1)带有RNase H活性。它会降解RNA模板及中断cDNA链的合成;(2)热稳定性差。RNA以各种复杂的多级结构存在,提高逆转录反应的温度,破坏其复杂结构的稳定性有利于逆转录的顺利进行,但同时也使酶的活性大大降低。Goldenstar® RT6逆转录酶解决了上述两个问题。通过删除M-MLV RT的RNase H活性,能有效减少RNA模板的降解,使其聚合酶活性和持续性大大增强;其后通过随机突变筛选出热稳定性强的逆转录突变体,使其反应温度提高至50°C,有利于含复杂结构RNA的逆转录进行。

■ 产品组成

组分	TSK301S (30次)	TSK301M (100次)
Goldenstar® RT6 (200 U/ µL)	30 µL	100 µL
5× Goldenstar® Reaction Buffer	150 µL	500 µL
Oligo(dT) ₁₇ (50 µM)	40 µL	120 µL
Randomer (50 µM)	40 µL	120 µL
dNTP Mix (10 mM)	40 µL	120 µL
DTT (0.2 M)	40 µL	120 µL
RNase-free Water	1.0 mL	1.0 mL

■ 产品应用

本产品合成的第一链cDNA可广泛用于第二链cDNA合成、PCR扩增、杂交、cDNA文库制作、全长cDNA合成等。

■ 产品特点

- RNase H活性缺失,产量高,产物长;
- 热稳定性强,有利于含复杂结构RNA的逆转录进行。

■ 使用方法

通常采用常规逆转录操作方法即可;若RNA结构复杂、GC含量高、目标序列长,或为了获得更高的逆转录效率,可采用优化的逆转录操作方法。

A. 常规逆转录操作方法

- 1) 将RNA模板和试剂盒中的各种组分置于冰上融解备用。

- 2) 在无核酸酶的微量离心管中按照下方表格在冰上配制反应体系(20 µL):

组分	用量
5× Goldenstar® Reaction Buffer	4 µL
Goldenstar® RT6 (200 U/ µL)	1 µL
Oligo(dT) ₁₇ (50 µM) or Randomer (50 µM) ^a	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
DTT	1 µL
RNA模板 ^b	见标注
RNase-free Water	Up to 20 µL

- a. 若产物用于Real-time Quantification PCR,推荐使用Randomer逆转录引物;若产物用于多个长片段基因扩增,推荐使用Oligo (dT)₁₇逆转录引物;若产物用于单个长片段基因扩增,且因目的基因表达量低等因素导致扩增效果不佳,推荐使用基因特异性引物(推荐用量为2 pmol),同时添加Oligo (dT)₁₇作为补偿方案,以防止特异性引物设计时的缺陷。

- b. 模板为总RNA时,推荐用量为10 ng~5 µg;模板为mRNA时,推荐用量为0.5 ng~500 ng。

- 3) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心。根据所使用的逆转录引物设置逆转录程序:

若所使用的逆转录引物为Oligo(dT)₁₇或基因特异性引物,50°C孵育30~50 min。

若所使用的逆转录引物为Randomer,25°C孵育10 min,50°C孵育30~50 min或15 min(产物用于Real-time Quantification PCR)。

- 4) 85°C孵育5 min,逆转录产物置于冰上或冷藏备用。

B. 优化的逆转录操作方法

- 1) 将RNA模板和试剂盒中的各种组分置于冰上融解备用。
- 2) 在无核酸酶的微量离心管中按照下方表格在冰上配制反应体系:

组分	用量
Oligo(dT) ₁₇ (50 µM) or Randomer (50 µM) ^a	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
RNA模板 ^b	见标注
RNase-free Water	Up to 14 µL

- a. 见<常规逆转录操作方法>标注a。

- b. 见<常规逆转录操作方法>标注b。

- 3) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心,65°C孵育5 min。

- 4) 反应液迅速置于冰上冷却,短暂离心后加入下方组分:

组分	用量
5× Goldenstar® Reaction Buffer	4 µL
Goldenstar® RT6	1 µL
DTT	1 µL

- 5) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心。根据所使用的逆转录引物设置逆转录程序:

若所使用的逆转录引物为Oligo(dT)₁₇或基因特异性引物,50°C孵育30~50 min。

若所使用的逆转录引物为Randomer,25°C孵育10 min,50°C孵育30~50 min或15 min(产物用于Real-time Quantification PCR)。

- 6) 85°C孵育5 min,逆转录产物置于冰上或冷藏备用。

■ 注意事项

- 实验中应避免RNase污染,防止RNA降解或实验中的交叉污染。操作人员需佩戴口罩和一次性手套,实验中经常更换手套,使用RNase-free耗材。
- 为保证逆转录成功,请使用高质量的RNA。推荐使用琼脂糖凝胶电泳的方法检测RNA完整度。
- 本产品中各组分在冰上解冻后,应充分混匀并短暂离心后使用。
- 逆转录产物用于扩增反应时,其使用量不应超过总反应体积的10%。
- 逆转录酶的一个活性单位被定义为:使用Poly(A)为模板, Oligo(dT)₁₇为引物,在37°C反应10 min,将1 nmol的dTTP转化为产物所需的酶量。

■ 应用实例

· Reverse transcription for Real-time Quantification PCR

实例为使用本产品进行小鼠脑组织总RNA的逆转录,产物用于MOCT4基因的qPCR扩增。

1. 逆转录反应

1) 本产品逆转录体系在冰上按以下组分配置;对照产品逆转录体系按其说明书配置。

组分	用量
5×Goldenstar® Reaction Buffer	4 μL
Goldenstar® RT6 (200 U/ μL)	1 μL
Randomer (50 μM)	1 μL
dNTP Mix (10 mM)	1 μL
DTT	1 μL
Mouse brain Total RNA (1 μg/μL)	1 μL
RNase-free Water	11 μL

05

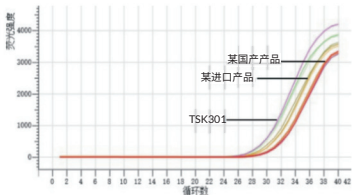
本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心,按照下方反应条件进行逆转录反应:

温度	时间
25°C	10 min
50°C	15 min
85°C	5 min

2.Real-time Quantification PCR反应

在进行Real-time Quantification PCR反应时,需要对逆转录产物进行稀释(建议稀释3~10倍),使内参基因Ct值在15~20之间,取1 μL稀释后的cDNA为模板进行qPCR反应,结果如下:



注:针对小鼠MOCT4基因设计qPCR引物,使用本公司2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) (目录号:TSE202)进行qPCR反应。

· Reverse transcription for long fragment amplification

实例为使用本产品及其他两家公司的逆转录试剂盒分别进行小鼠脑组织总RNA的逆转录,产物用于HDAC6基因的PCR扩增。

06

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

1. 逆转录反应

1) 本产品逆转录体系在冰上按以下组分配置;对照产品逆转录体系按其说明书配置。

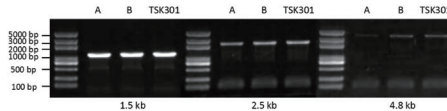
组分	用量
5× Goldenstar® Reaction Buffer	4 μL
Goldenstar® RT6 (200 U/ μL)	1 μL
Oligo(dT) ₁₇ (50 μM)	1 μL
dNTP Mix (10 mM)	1 μL
DTT	1 μL
Mouse brain Total RNA (1 μg/μL)	1 μL
RNase-free Water	11 μL

2) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心,按照下方反应条件进行逆转录反应:

温度	时间
50°C	30 min
85°C	5 min

2.PCR反应

取1 μL逆转录产物进行PCR反应,产物电泳图结果如下:



07

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

注:以小鼠HDAC6基因末端设计反向PCR引物,前端不同位置设计三条正向引物,用本公司金牌Mix (目录号:TSE101)按程序98°C 2 min;98°C 10 s,60°C 30 s,72°C 1 min,35 cycles;72°C 2 min扩增大小分别为1.5 kb、2.5 kb、4.8 kb的目标序列。A为某国内知名逆转录试剂盒产物的扩增结果;B为某进口知名逆转录试剂盒产物的扩增结果。

■ 保存条件

-25~-15°C保存,保质期1年。

■ 技术支持

公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。



08

网址:www.tsingke.com.cn
地址:湖北省鄂州市葛店开发区东湖高新智慧城7栋

1.1.3.20211119