

Goldenstar® RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2

■ 目录号

TSK302S

TSK302M

■ 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氏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55°C,有利于含复杂结构RNA的逆转录进行。本产品提供的gDNA Remover可彻底去除RNA模板中残留的基因组DNA,qPCR结果更加可靠,并可简化qPCR引物设计,无需跨内含子设计引物。

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品组成

组分	TSK302S (30次)	TSK302M (100次)
Goldenstar® RT6 (200 U/ μL)	30 μL	100 μL
5× Goldenstar® Reaction Buffer	150 μL	500 μL
gDNA Remover	40 μL	120 μL
10× gDNA Remover Buffer	40 μL	120 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;
- 快速去除基因组污染。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 使用方法

- 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 (10 μL):

组分	用量
RNA模板 ^a	见标注
gDNA Remover	1 μL
10× gDNA Remover Buffer	1 μL
RNase-free Water	Up to 10 μL

- a. 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,42°C孵育2 min,60°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 (200 U/ μL)	1 μL
Oligo(dT) ₁₇ (50 μM) or Randomer (50 μM) ^b	1 μL
dNTP Mix (10 mM)	1 μL
DTT	1 μL
RNase-free Water	2 μL

- b. 若产物用于Real-time Quantification PCR,推荐使用Randomer逆转录

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

- 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。
- 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,55°C孵育30~50 min。
 - 若所使用的逆转录引物为Randomer,25°C孵育10 min,55°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完整性。
- 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NIH 3T3细胞总RNA的逆转录,产物用于PGC1α基因的qPCR扩增。

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

1. 逆转录反应

1) 本产品逆转录体系按照下方表格在冰上配制,对照产品逆转录体系按其说明书配制。

组分	用量
NIH 3T3 Total RNA (1 µg/µL)	1 µL
gDNA Remover	1 µL
10× gDNA Remover Buffer	1 µL
RNase-free Water	7 µL

2) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心, 42°C 孵育 2 min, 60°C 孵育 5 min。

3) 反应液迅速置于冰上冷却, 短暂离心后加入下方组分:

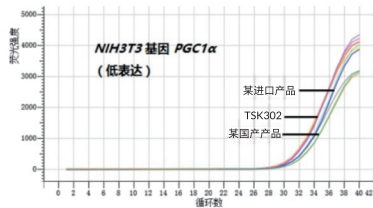
组分	用量
5× Goldenstar® Reaction Buffer	4 µL
Goldenstar® RT6 (200 U/ µL)	1 µL
Randomer (50 µM)	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
DTT	1 µL
RNase-free Water	2 µL

4) 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
55°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NIH3T3的PGC1α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。

1. 逆转录反应

1) 本产品逆转录体系按照下方表格在冰上配制,对照产品逆转录体系按其说明书配制。

组分	用量
Mouse brain Total RNA (1 µg/µL)	1 µL
gDNA Remover	1 µL
10× gDNA Remover Buffer	1 µL
RNase-free Water	7 µL

2) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心, 42°C 孵育 2 min, 60°C 孵育 5 min。

3) 反应液迅速置于冰上冷却, 短暂离心后加入下方组分:

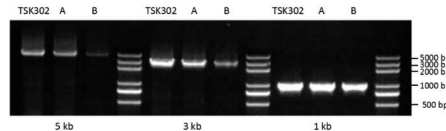
组分	用量
5× Goldenstar® Reaction Buffer	4 µL
Goldenstar® RT6 (200 U/ µL)	1 µL
Oligo(dT) ₁₇ (50 µM)	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
DTT	1 µL
RNase-free Water	2 µL

4) 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
55°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:



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5 kb, 3 kb, 1 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

本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。

