

EasyScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AE301

保存: -20°C保存两年。

产品说明

本产品以 RNA 为模板, 用 EasyScript® RT /RI Enzyme Mix, 2×ES 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

- EasyScript® RT 无 RNase H 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≤8 kb。

适用范围

高拷贝基因检测。

试剂盒组成

Component	AE301-02	AE301-03
EasyScript® RT/RI Enzyme Mix	50 µl	100 µl
2×ES 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, 请将各组分点甩离心。

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×ES Reaction Mix	10 µl
EasyScript® 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 EasyScript® RT/RI。



推荐qPCR体系与条件 (以20 μ l 反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
2 \times TransStart [®] Top/Tip Green qPCR SuperMix	10 μ l	1 \times
Passive Reference Dye (50 \times) (optional)	0.4 μ l	1 \times
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	20 μ l	-

qPCR (三步法)

94 $^{\circ}$ C 30 sec
 94 $^{\circ}$ C 5 sec
 50-60 $^{\circ}$ C 15 sec ★
 72 $^{\circ}$ C 10 sec ★

40-45 cycles

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。

qPCR (两步法)

94 $^{\circ}$ C 30 sec
 94 $^{\circ}$ C 5 sec
 60 $^{\circ}$ C 30 sec ★

40-45 cycles

Dissociation Stage

推荐PCR体系与条件 (以50 μ l 反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
2 \times TransTaq [®] HiFi PCR SuperMix II	25 μ l	1 \times
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 μ l	-

PCR

94 $^{\circ}$ C 2-5 min
 94 $^{\circ}$ C 30 sec
 50-60 $^{\circ}$ C 30 sec
 72 $^{\circ}$ C 1-2 kb/min
 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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

