

EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AE311

保存: -20°C保存两年。

产品说明

本产品以RNA为模板, 在同一反应体系中, 合成第一链cDNA的同时去除RNA模板中残留的基因组DNA。反应结束后, 只需在85°C加热5秒钟, 即可同时失活EasyScript® RT/RI与gDNA Remover。

特点

- 在同一反应体系中, 同时完成反转录与基因组DNA的去除, 操作简便, 降低污染机率。
- 产物用于qPCR: 反转录15分钟; 产物用于PCR: 反转录30分钟。
- 反应结束后, 同时热失活RT/RI与gDNA Remover。与传统的用DNase I预处理RNA的方法相比, 避免了处理后热失活DNase I对RNA的损伤。
- 操作简单。
- 合成片段≤8 kb。

适用范围

高拷贝基因检测。

试剂盒组成

Component	AE311-02 (50 rxns)	AE311-03 (100 rxns)
EasyScript® RT/RI Enzyme Mix	50 µl	100 µl
gDNA Remover	50 µl	100 µl
2×ES Reaction Mix	500 µl	1 ml
Random Primer (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合成和gDNA去除

1、加入

Component	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5µg/5-500 ng
Anchored Oligo(dT) ₁₈ Primer (0.5 µg/µl)	1 µl
or Random Primer (0.1 µg/µl)	1 µl
or GSP	2 pmol
2×ES Reaction Mix	10 µl
EasyScript® RT/RI Enzyme Mix	1 µl
gDNA Remover	1 µl
RNase-free Water	Variable
Total volume	20 µl

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。

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与gDNA Remover。

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

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°C 30 sec
94°C 5 sec
60°C 30 sec ★

} 40-45 cycles

Dissociation Stage

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。
- 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。

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

