

TransScript® II First-Strand cDNA Synthesis SuperMix

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AH301

保存: -20°C保存两年。

产品说明

本产品以RNA为模板, 用TransScript® II RT/RI Enzyme Mix、2×TS II Reaction Mix在42°C-55°C条件下高效合成第一链cDNA, 最佳反应温度50°C。操作简便, 降低了操作过程中的污染机率。

特点

- 高热稳定性: 反应温度42°C-55°C。
- TransScript® II RT无RNaseH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)₂₀ 设计独特, 能锚定紧邻mRNA Poly(A)⁺的5'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≤15 kb。

适用范围

- cDNA文库构建、引物延伸、3'和5' RACE。
- 高拷贝、低拷贝基因检测。
- 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

试剂盒组成

Component	AH301-02	AH301-03
TransScript® II RT/RI Enzyme Mix	50 µl	100 µl
2×TS II Reaction Mix	500 µl	1 ml
Random Primer (0.1 µg/µl)	50 µl	100 µl
Anchored Oligo(dT) ₂₀ 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	50 ng-5 µg/5-500 ng
Anchored Oligo(dT) ₂₀ (0.5 µg /µl)	1 µl
or Random Primer(N9) (0.1 µg/µl)	1 µl
or GSP	2 pmol
2×TS II Reaction Mix	10 µl
TransScript® II RT/RI Enzyme Mix	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)₂₀ 或基因特异引物 (GSP), 产物用于qPCR: 50°C孵育15分钟; 产物用于PCR: 50°C孵育30分钟。
- 如用Random Primer(N9), 25°C孵育10分钟后, 产物用于qPCR: 50°C孵育15分钟; 产物用于PCR: 50°C孵育30分钟。
- 对于高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板, 可选择55°C孵育30分钟。

3、85°C加热5秒钟失活 *TransScript*[®] II RT/RI。

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

