

THERMO RT Kit THERMO 反转录试剂盒

包装量:

目录编号	包装单位
154401	25次
154402	50次

Components	154401	154402
THERMO H ⁻ RTase/RNase Inhibitor Mix	25 µl	50 µl
5×RT Reaction Mix	100 µl	200 µl
Oligo(dT) ₁₈ (0.5 µg/µl)	25 µl	50 µl
Random primer (N6)	25 µl	50 µl
RNase free H ₂ O	1 ml	1 ml

产品储存: -20℃ 保存, 有效期 12 个月

制品说明: 本制品以 RNA 为模板, 用 THERMO H⁻ RTase /RI Mix、5×RT Reaction Mix 高效合成第一链 cDNA, 操作简单。制品使用通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 THERMO H⁻ RTase。同时经过多点突变, 提高了反转录温度耐受性, 可以在 45-55℃ 进行反转录。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H 活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA, 因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。本酶 M-MuLV(RNase H⁻) 的 RNase H 活性缺失, 与 M-MuLV 相比, 具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高, 二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

适用范围: 第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

特点: 合成cDNA片段长度最高可达12 kb。

第一链cDNA合成(以20 µl反应体系为例)

1. 加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5 µg/5-500 ng
Oligo(dT) ₁₈ (0.5 µg/µl) or	1 µl
Random Primer(0.1 µg/µl) or	1 µl
GSP(Gene Specific Primer)	2 pmol
5×RT Reaction Mix	4 µl
THERMO H ⁻ RTase/RI Mix	0.8-1µl (见注意事项 4)
RNase free H ₂ O to final volume	20 µl

2. 轻轻混匀

如用Oligo(dT)₁₈或基因特异引物(GSP), 50℃孵育50min。

如用Oligo(dT)₁₈在55℃反转录, 首先应该42℃孵育5 min, 然后55℃孵育50min。

如用Random Primer, 25℃孵育10 min, 50℃孵育50 min。

3. 65℃加热15 min失活THERMO H⁻ RTase。

注意: GC含量高(>50%)或者二级结构复杂模板, 可以提高反转录温度至55℃左右。

RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板。

建议PCR条件(以50 μl 反应体系为例)

Components	Volume	Final Concentration
cDNA Template	2 μl	as required
Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
10 \times Taq Buffer (含 Mg^{2+})	5 μl	1 \times
2.5 mM dNTPs	4 μl	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.5 μl	2.5 units
ddH ₂ O to final volume	50 μl	Not applicable

PCR 循环

94 $^{\circ}\text{C}$ 2-5 min

94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec

50-60 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec

72 $^{\circ}\text{C}$ 1-2 kb/min

72 $^{\circ}\text{C}$ 5-10 min



30-40 cycles

注意事项:

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. **可选步骤（一般不需要）**：如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构，可以先只加RNA模板、引物和和RNase free H₂O混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 变性5分钟，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
4. THERMO H⁻ RTase/RNase Inhibitor Mix非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。**可以每次按照0.8 μl 使用，也不影响使用效果。**