

BiomarkerScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit

目录: RK02002

规格: 100 RXN (20 μ L / RXN)



1 试剂盒组成:

试剂盒组成	目录号	100 RXN
BiomarkerScript II Enzyme Mix (10 \times)	RM02105	200 μ L
BiomarkerScript II Reaction Mix (2 \times)	RM02106	1.25 mL
Oligo d(T) ₂₃ VN* (50 μ M) **	RM02107	200 μ L
Random Primer Mix (60 μ M)**	RM02108	200 μ L
dNTPs (10 mM each)	RM02109	100 μ L
Nuclease-free H ₂ O	RM02110	1.25 mL

*V = A, G or C; N = A, G, C or T **Contains 1 mM dNTP.

注: 将所有试剂储存在-20 $^{\circ}$ C。

2 试剂盒介绍

BiomarkerScript II Enzyme Mix包含了BiomarkerScript II逆转录酶和RNase抑制剂, BiomarkerScript II Reaction Mix含有优化的反应Buffer。BiomarkerScript II逆转录酶是一种重组M-MuLV逆转录酶, 拥有较低的RNase H活性同时兼具增强的热稳定性。与野生型M-MuLV相比, 重组M-MuLV逆转录酶可以在更高的温度下合成第一链cDNA。该酶在高达48 $^{\circ}$ C时仍具有活性, 特异性和cDNA产量更高。

该试剂盒提供两种逆转录的引物。Oligo-dT引物[d(T)₂₃VN]迫使引物退火至Poly(A)尾的起始处。优化的Random Primer Mix 特异性较低, 所有RNA, 包括mRNA, rRNA, tRNA均可作为逆转录模板。本试剂盒可扩增长达10 kb的cDNA。

3 质量控制

使用Jurkat细胞总RNA和d(T)₂₃VN引物在RT反应中测试BiomarkerScript II第一链cDNA合成试剂盒的性能。通过检测9.2 kb的原纤维蛋白基因扩增子来验证转录的cDNA长度。

4 第一链cDNA合成反应

RNA和引物在65~70 $^{\circ}$ C下变性5 min可以去除可能阻碍cDNA合成的二级结构。但是, 在许多情况下可省略此步骤。

为获得最大产量和长度建议在42 $^{\circ}$ C孵育1 hr。

5 逆转录引物的选择

- Oligo-dT引物对于大多数应用是首选的, 因为它确保所有cDNA拷贝终止于mRNA的3'末端并可获得最高产量的全长cDNA。锚定Oligo-dT的引物[d(T)₂₃VN]迫使引物退火至Poly(A)尾的起始处, 从而防止在Poly(A)尾部的内部位点进行逆转录。
- Random Primer Mix是d(N)₆优化引物Mix。随机引物可以覆盖整个RNA模板的随机位点, 包括mRNA和非多腺苷酸化的RNA(如核糖体RNA)。随机引物合成的cDNA较短, 可用于检测多种RT-PCR产物。Random Primer Mix在各种RNA模板的cDNA合成中均展现出良好的性能。
- 当用特异引物合成cDNA时, cDNA产物仅可用于扩增该转录本。在RNA投入量很低(低于10 ng)并且仅需要一种特定的cDNA时, 使用特异引物进行cDNA合成无疑是最好的选择。
- 推荐的引物浓度:

引物种类型	Oligo d(T) ₂₃ VN	随机引物	特异引物
终浓度	5 μ M	6 μ M	0.1~1 μ M

6 第一链cDNA合成方案

实验开始前冰上融解各组分并振荡混匀。

简易流程

- 混合下列组分，42 °C 孵育1 hr。如果使用Random Primer Mix，建议42 °C 反应前先在25 °C 反应5 min。

组分	
Nuclease-free H ₂ O	Up to 20 µL
RNA模板	Up to 1 µg
d(T) ₂₃ VN	2 µL
10 mM dNTPs	1 µL
BiomarkerScript II Reaction Mix (2×)	10 µL
BiomarkerScript II Enzyme Mix (10×)	2 µL
总体积	20 µL

- 在80 °C加热5 min使酶失活。对于下游PCR应用，cDNA产物的加入体积不应超过PCR反应总体积的1/10。

标准流程

如果需要变性模板RNA，请使用以下方案。

- 在无RNase的PCR管中加入RNA模板和d(T)₂₃VN引物。

组份型	1× RXN
RNA模板	1~6 µL (Up to 1 µg)
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 8 µL
总体积	8 µL

- 在65 °C 下使RNA模板/d(T)₂₃VN 变性5 min 短暂离心并迅速置于冰上。
- 然后向上述PCR管中加入以下组分。

组份型	1× RXN
BiomarkerScript II Reaction Mix (2×)	10 µL
BiomarkerScript II Enzyme Mix (10×)	2 µL

- 混匀后，42 °C 孵育1 hr。如果使用Random Primer Mix，建议42 °C 反应前先在25 °C 反应5 min。
- 80 °C加热5 min使酶失活，cDNA产物储存在-20 °C。对于下游PCR应用，cDNA产物的加入体积不应超过PCR反应总体积的1/10。

无RT阴性对照反应（可选）

混合下列组分，在42 °C下孵育1 hr。

- 在无RNase的PCR管中加入RNA模板和d(T)₂₃VN引物。

组分	1× RXN
RNA模板	Up to 1 µg
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2 µL
BiomarkerScript II Reaction Mix (2×)	10 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 20 µL
总体积	20 µL

7 常见问题解答

cDNA产量低

- 通过变性琼脂糖凝胶电泳检查RNA的完整性。
- RNA的A₂₆₀ /A₂₈₀ 比值大于1.7。乙醇沉淀，然后70%乙醇洗涤可以除去大多数污染物，例如EDTA和胍类。用氯化锂沉淀可以去除多糖。
- 苯酚/氯仿提取和乙醇提取可以去除蛋白污染，如蛋白酶。
- 一些靶RNA可能包含RT的强终止序列；建议使用随机引物而不是d(T)₂₃VN。
- 使用足量的RNA。

8 cDNA合成的注意点

- 高纯度完整的RNA对于RT-PCR检测至关重要。
- 总RNA或mRNA都可用于逆转录反应，通常总RNA足以进行大多数RT-PCR分析。