

PCR 反应

1. 取 10% 第一链反应液 (2 μ l) 转移到合适的无菌薄壁 PCR 管中。注意: 制备的第一链反应液可以不纯化直接用作 PCR 模板, 用量为 1-5 μ l。如使用过量, 第一链反应液中的盐和 Random primers 将会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。如果有必要将第一链反应液纯化, 可按下列方式纯化: cDNA 合成反应结束后, 在反应体系中加入 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟, 用 DP1501 回收 cDNA。

2. 按次序加入下列试剂:

5 μ l 10X PCR Buffer

1 μ l 10mM dNTP mix

1 μ l 10 μ M Primer #1 (用户自备)

1 μ l 10 μ M Primer #2 (用户自备)

x μ l H₂O (使反应总体积为 49 μ l)

1 μ l Taq DNA polymerase

3. 混匀, 如需要可在液面上加 50 μ l 矿物油(一至两滴)。

4. 扩增反应。根据用户引物的退火温和所扩增基因在原组织或细胞中的拷贝数, 参考 Taq DNA polymerase 的技术参数, 设定扩增条件。具体说明参见 Taq DNA 聚合酶说明书。通常循环 30-35 次。

5. DNA 扩增产物用 Agarose 电泳和 EB 染色观测。



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation



北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

Fast Supermo III RT Mix cDNA 第一链合成 Mix (With gDnase)

储存: -20 $^{\circ}$ C 可以储存一年

货号: PR6301 50次 (20 μ l 反应体系)

PR6302 200次 (20 μ l 反应体系)

产品描述:

本试剂盒是一种高效快速并可以去除基因组DNA污染的反转录系统, 其包含了gDnase, 以及经过基因改造缺失了RnaseH活性, 增加了扩增活性和耐热的SupermoIII M-MuLV。gDnase可以有效地去除RNA中的DNA, 有效避免Total RNA中的DNA的污染, 保持了RNA的完整性。M-MuLV通过点突变使RNase H活性缺失, 而保持完全的mRNA-directed DNA多聚合活性, 有效增强了cDNA的合成效率、增加了该酶与模板/引物的亲和力, 从而增加了酶的活性和持续合成能力。本试剂盒优化了逆转录反应液, 反应的模板量(Total RNA)可在0.2-2 μ g范围之间进行逆转录反应。cDNA合成后进行PCR扩增既可检测到长cDNA (>10 kb) 片段, 也可检测到低丰度cDNA样品。本试剂盒提供了由Total RNA或mRNA合成cDNA第一链所需要的全部试剂。合成的第一链cDNA可广泛用于2nd Strand的合成、杂交、PCR扩增、Real-Time PCR反应等。本品还具有与RNA模板高亲和性的特点, 其能通读GC含量高, 二级结构复杂的RNA模板。

产品特点及应用范围

- ① 反转录效率高, 反转录效率可达90%以上。
- ② 适合2K以上长片段扩增。

地址: 北京海淀区留学人员创业园

电话: 010-62951781

传真: 010-62951781

网址: www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com

- ③ 操作简单快捷。耐热性好，cDNA扩增片段更长。
- ④ 通读复杂模板，能通读GC含量高，二级结构复杂的RNA模板。
- ⑤ 后续兼容性好，能够配合荧光定量检测产品，灵敏度高，稳定性好。应用于PCR, qPCR等。

⑥ 有全新高效的gDNase，3min高效去除gDNA

⑦ 1ul的gDNase可消化1ug的DNA。

产品组成:

组分名称	50次 (PR6301)	200次 (PR6302)
gDnase	50ul	200ul
10× Buffer	50ul	200ul
Stop Buffer	50ul	200ul
2× Reverse transcriptase MIX	500ul	2ml
FQ-RT primer Mix	50ul	200ul
RNAfree water	1ml	4ml

操作步骤1: (RNA消化实验操作步骤)

1、先在冰浴上配置消化反应液，体系如下:

<u>gDnase</u>	<u>1ul</u>
<u>10× Buffer</u>	<u>1ul</u>
<u>Total RNA</u>	<u>约1ug</u>
<u>Rnase-free H₂O</u>	<u>up to 10ul</u>

在PCR仪上或者水浴上42℃ 2min

2、然后取出加入1ul的Stop Buffer在PCR仪上或者水浴上65℃ 2min后取出以备逆转录使用。

操作步骤2 (反转录试验操作步骤)

1. 按以下组分配制反转录反应液

2.

<u>Total RNA or Poly(A) RNA</u>	<u>0.2-2μg</u>
<u>Reverse transcriptase MIX</u>	<u>10ul</u>
<u>FQ-RT primer Mix</u>	<u>1ul</u>
<u>H₂O</u>	<u>up to 20ul</u>

2. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应:

① 50℃ , 15min;

② 72℃, 2min;

得到的cDNA可以直接用于后续的PCR等反应，也可以-20℃冻存以备以后使用。

注意事项:

1. 用于 cDNA 合成的溶液试剂尽可能的 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时,首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后,再将溶液进行过滤除菌处理。
2. Dnase 中不含 RNA 酶抑制剂,要谨慎操作,注意 Rnase 酶的污染。
3. 避免反复多次冻融 RNA,以避免 RNA 的降解。
4. 试剂盒各组成成分应保存在-20° C。
5. cDNA 产物应保存在-20° C。
6. 反转录体系可以根据需要相应扩大。
7. 根据实验需求不同,也可以选用 Oligo-dT Primer 或 Gene Specific Primer,引物使用量如下: Oligo-dT Primer 50 pmol / 20 μl 反应体系, Gene Specific Primer 5 pmol /20 μl 反应体系。逆转酶以 RNA 为模板合成第一链 cDNA, RNA 的质量和数量直接影响逆转录的结果,如(模板的完整性、模板的纯度以及模板的加量)。