

ARScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit

目录号：RM0011（100 rxns）

保存条件： -20°C

产品内容

Component	100 rxns
ARScript, 200 U/μl	100 μl
5×RT Buffer	500 μl
Primer Mix	240 μl
dNTP Mix, 2.5 mM Each	500 μl
DTT, 0.1 M	240 μl
RNase-Free Water	1 ml

产品简介

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步实验配制的 cDNA 第一链合成试剂盒。该试剂盒中使用的 ARScript 逆转录酶是 M-MLV 由来的新型高效逆转录酶，新颖突变位点大幅提升酶的转录活性，cDNA 第一链合成的效率和产量更高，可利用 pg 级的总 RNA 或 mRNA 合成 cDNA 第一链。点突变消除 RNase H 活性，酶的延伸性能提高，有效改善逆转录酶与 RNA 模板的亲合力，可获得长至 12 kb 的 cDNA。精心优化的 RT Buffer 使逆转录酶应用范围更广，对后续的 PCR 以及定量 PCR 实验兼容性高。该试剂盒配备所有逆转录试剂，使用简单方便。适用于第一链 cDNA 的合成和后续的 RT-PCR、RT-qPCR，以及全长 cDNA 文库的构建等。

产品特点

- 高效的逆转录效率：**新颖突变位点大幅提升酶活性能，获得更高产量的 cDNA。
- 良好的延伸能力：**点突变消除 RNase H 活性，改善逆转录酶与 RNA 模板的亲合力，可获得长至 12 kb 的 cDNA。
- 灵敏度高：**可利用 pg 级的总 RNA 或 mRNA 模板合成 cDNA 第一链。
- 使用方便：**逆转录试剂盒中已配备所有逆转录试剂，仅需准备模板即可轻松完成逆转录。

使用方法

注意：1 ng-5 µg 总 RNA 可建立 20 µl 反应体系，如果总 RNA 量大于 5 µg，请按比例扩大反应体系。

i 逆转录操作步骤：

1. 将 RNA 模板、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、ARScript 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为 20 µl。

试剂	20 µl 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 µl	500 µM Each
Primer Mix	2 µl	
RNA Template	X µl	
5×RT Buffer	4 µl	1×
DTT, 0.1 M	2 µl	10 mM
ARScript, 200 U/µl	1 µl	
RNase-Free Water	up to 20 µl	

注意：1) 若起始 RNA 的量小于 50 ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂 (RNasin)。

2) Primer Mix 由 Oligo(dT)和 Random Primer 配制而成。

3. 涡旋震荡混匀，短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
4. cDNA 合成反应条件：
 - 1) 若下游进行荧光定量 PCR 检测，42°C 孵育 15 分钟，85°C 孵育 5 分钟。
 - 2) 若下游进行普通 PCR 检测，42°C 孵育 30-50 分钟，85°C 孵育 5 分钟。

注意：对于二级结构复杂或 GC 含量高的模板，可以提高逆转录温度至 50°C，增强逆转录效率。

5. 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。
6. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，或置于 -20°C 长期保存。

ii 若逆转录效率低，或 RNA 模板二级结构复杂、GC 含量高时，建议采用以下步骤：

1. 将 RNA 模板、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、ARScript 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为 13 µl。

试剂	20 µl 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 µl	500 µM Each
Primer Mix	2 µl	

RNA Template	X μ l	50 pg-5 μ g
RNase-Free Water	up to 13 μ l	

- 70°C 孵育 10 分钟，迅速冰浴 2 分钟。
- 短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
- 继续向以上反应液中加入以下试剂：

试剂	20 μ l 反应体系	终浓度
5 \times RT Buffer	4 μ l	1 \times
DTT, 0.1 M	2 μ l	10 mM
ARScript (200 U/ μ l)	1 μ l	

注意：1) 若起始 RNA 的量小于 50ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂 (RNasin)。

2) Primer Mix 由 Oligo (dT) 和 Random primer 配制而成。

- 进行 cDNA 第一链合成：
 - 若下游进行荧光定量 PCR 检测，50°C 孵育 15 分钟，85°C 孵育 5 分钟。
 - 若下游进行普通 PCR 检测，50°C 孵育 30-50 分钟，85°C 孵育 5 分钟。
- 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。
- 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，加入量应小于 PCR 反应体系的 1/10，或置于 -20°C 长期保存。

注意事项

- 在操作过程中应避免 RNase 污染，防止 RNA 降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行 RNA 操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
- 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 处理 12 小时，并在 120°C 下高压灭菌 30 分钟后使用，或者将玻璃器皿在 180°C 下干热灭菌 60 分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高压灭菌。
- 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回 -20°C，避免反复冻融。
- 若起始 RNA 的量小于 50 ng，建议加入 RNA 酶抑制剂 (RNasin)。