

RTase III Primer Flexible All-in-One Mix (with dsDNase)

REF: EG24102S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
RTase III Primer Flexible All-in-One Mix	400 µl
Oligo(dT) ₂₀ VN (50 µM)	100 µl
Random hexamers (50 µM)	100 µl
dsDNase	2×50 µl
10× dsDNase Buffer	200 µl
Nuclease-Free Water	2×1 ml

产品简介

RTase III Primer Flexible All-in-One Mix 是一款高效、便捷、减少污染的高质量一链 cDNA 合成预混液，包含 M-MLV GIII Reverse Transcriptase 及其反应 Buffer、RNA 酶抑制剂、dNTPs 等一链 cDNA 合成所需的多种组分，还需加入 RNA 模板、引物和水即可开始反应，操作非常方便。针对不同实验设计可灵活使用不同类型的逆转录引物，满足多样化的实验需求，可根据不同实验场景选择 Oligo(dT)₂₀VN 或 Random hexamers 或 Gene Specific Primers。使用该逆转录预混液 15 分钟内最长可获得 12 kb 大小的 cDNA。

从细胞中提取的 RNA 往往存在基因组 DNA 污染，如果逆转录前不将其去除，下游 qPCR 反应时基因组 DNA 与 cDNA 会同时被扩增（尤其当引物设计在同一外显子上时），从而影响基因表达定量准确性。本试剂盒采用 dsDNase 高效去除基因组 DNA 污染，dsDNase 能够特异性消化双链 DNA（dsDNA 或 DNA-RNA 杂合链中的 DNA 链），并且具有热敏感性，在逆转录温度下即可快速不可逆地失活。与传统使用 DNase I 去除基因组 DNA 污染的方法相比，dsDNase 无需额外加入 EDTA 进行失活，不仅节省实验时间，而且降低了对逆转录反应的抑制。

使用方法

1. Total RNA

基因组去除

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
Total RNA ^a	50 ng~1 µg
dsDNase	1 µl
10× dsDNase Buffer	1 µl
Nuclease-Free Water	To 10 µl

a. 推荐采用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 37°C 温育 2 min，以去除基因组 DNA 污染；

注：若 RNA 中基因组 DNA 污染严重，可适当延长 37°C 温育时间至 5 min。

④ 65°C 温育 2 min，使 dsDNase 失活，冰上放置。

第一链 cDNA 合成

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量（实验组）
“实验 (1)” 反应产物	10 µl
RTase III Primer Flexible All-in-One Mix	4 µl
Oligo(dT) ₂₀ VN (50 µM)	1 µl
或 Random hexamers (50 µM)	1 µl
或 Gene Specific Primers (50 µM)	0.1 µl
Nuclease-Free Water	To 20 µl

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 55°C 温育 15 min；

注：若目标 RNA 不含 Poly(A) 结构，可预先 25°C 温育 10 min。

④ 反应结束后，85°C 温育 5 min，以终止反应；

⑤ 将获得的 cDNA 溶液置于冰上，用于后续实验；或立即保存于 -20°C。

注：

 1. 后续实验为克隆实验，若 RNA 来源于真核生物，只需使用 Oligo(dT)₂₀VN 即可，加入 Random hexamers 会降低全长 cDNA 的产量；若 RNA 来源于原核生物，只需使用 Random hexamers 或 Gene Specific Primers。

 2. 后续实验为 qPCR，请同时加入 Oligo(dT)₂₀VN 和 Random hexamers 以获得在 mRNA 不同位置逆转录效率均一的 cDNA。

2. miRNA

基因组去除

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
miRNA	10 pg~200 ng
dsDNase	1 μ l
10 $\times$ dsDNase Buffer	1 μ l
Nuclease-Free Water	To 10 μ l

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 37°C温育 2 min，以去除基因组 DNA 污染；

注：若 RNA 中基因组 DNA 污染严重，可适当延长 37°C温育时间至 5 min。

④ 65°C温育 2 min，使 dsDNase 失活，冰上放置。

第一链 cDNA 合成

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量 (实验组)
“实验 (1)” 反应产物	10 μ l
RTase III Primer Flexible All-in-One Mix	4 μ l
Stem-loop primer (5 μ M) ^b	1 μ l
Nuclease-Free Water	To 20 μ l

b. 茎环引物推荐终浓度 0.25 μ M，可在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 55°C温育 15 min；

④ 反应结束后，85°C温育 5 min，以终止反应；

⑤ 将获得的 cDNA 溶液置于冰上，用于后续实验；或立即保存于 -20°C。

miRNA 茎环引物及 qPCR 引物设计

1. Stem-loop RT 引物设计：基于通用的茎环结构，只需要按照不同的 miRNA 序列修改最末端 6 个碱基即可。通用茎环结构序列为：
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC；

2. 以 miR-1-5p 为例，其序列为 CAUACUCCUUAUACAUGCCCAUA，只需在通用茎环序列后加上 miRNA 3' 末端的 6 个碱基的反向互补序列，即 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC “TATGGG”；

3. qPCR 上游引物设计：miRNA 序列除去 3' 端 6 个碱基的剩余部分作为上游引物，如 miR-1-5p 的上游引物为 (注意把 U 改为 T)：CATACTTCCTTACATG。检查引物的 T_m 值，如果 T_m 值较低，则在 5' 端加 GC 使 T_m 值接近 60°C。因此 miR-1-5p 的上游引物可设计为：GCCGCCATACTTCCTTACATG，60.3°C；

4. 下游引物是通用的，序列为 GTGCAGGGTCCGAGGT；

5. 引物设计好后，需要通过预试验检测引物的特异性。一般需要做熔解曲线来检测引物的特异性；同时最好将 PCR 产物进行电泳检测产物是否单一（产物长度很短，需要 3% 以上的琼脂糖胶）。

注意事项

1. 所有试剂使用前请轻轻上下颠倒混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用；
2. 为了防止 RNase 污染，请保持实验区域洁净；
3. 操作时需穿戴干净的手套、口罩；
4. 实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase-free。