

版本号: KR151125

FastQuant RT Kit (with gDNase)

FastQuant cDNA第一链合成试剂盒

(去基因组)

目录号: KR106

产品内容

产品组成	KR106-01 (25 rxn)	KR106-02 (100 rxn)
5×gDNA Buffer	50 µl	200 µl
FQ-RT Primer Mix	50 µl	200 µl
RT Enzyme Mix	25 µl	100 µl
10×Fast RT Buffer	50 µl	200 µl
RNase- Free ddH ₂ O	1 ml	2×1 ml

储存条件

该试剂盒使用干冰运输，-20℃可保存一年。

产品简介

FastQuant cDNA第一链合成试剂盒是一种高效、快速并可以去除基因组DNA污染的反转录系统。本试剂盒含有高效去除基因组DNA的gDNase；通过42°C，3 min即可去除gDNA，有效避免Total RNA中基因组DNA的干扰。本试剂盒所含的高效反转录酶FastQuant RT Enzyme，42°C，15 min即可完成cDNA第一链的合成。另外，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

反转录效率高：反转录效率可达90%以上；

操作简单快速：反应体系配制简单，21 min完成cDNA第一链的合成；

通读复杂模板：能够作用于GC含量高，二级结构复杂的RNA模板；

后续兼容性好：后续配合荧光定量检测产品，灵敏度高、稳定性好。

适用范围

RT-PCR；荧光定量PCR

注意事项

1. 下列操作步骤适用于模板量为50 ng-2 µg的总RNA，如果总RNA量大于2 µg，请按比例扩大反应体系。
 2. 在冰上进行操作，防止RNA发生降解。
 3. 不需分开变性和退火两个步骤。但是对于二级结构很复杂的RNA模板，推荐使用变性步骤，即在操作步骤之前，将模板RNA在65°C 孵育5min后迅速转移到冰上，进行下一步操作。
 4. 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。
 5. 使用Gene Specific Primer时，反转录反应可设置为42°C，15 min。当PCR反应有非特异性扩增时，将反转录温度升到50°C会有改善。
 6. 反转录体系可以根据需要相应扩大。
-

操作步骤

使用快速反转录试剂盒合成第一链cDNA

50 ng-2 µg总RNA可建立20 µl反应体系。

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH₂O在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

以下操作步骤请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先配制成Mix，然后再分装到每个反应管中。

2. 按照表1的基因组DNA的去除体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 µl
Total RNA	-
RNase-Free ddH ₂ O	补足到10 µl

3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。

表2 反转录反应体系

组成成分	使用量
10×Fast RT Buffer	2 µl
RT Enzyme Mix	1 µl
FQ-RT Primer Mix	2 µl
RNase-Free ddH ₂ O	补足到10 µl

4. 将反转录反应中的Mix，加到gDNA去除步骤的反应液中，充分混匀。
 5. 42℃，孵育15 min。
 6. 95℃，孵育3 min之后放于冰上，得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。
-

对RNA模板的要求

逆转录酶以RNA为模板合成第一链cDNA，模板RNA的质量和数量直接影响逆转录的结果。

1. 模板的完整性：模板RNA的完整性对逆转录非常重要，若RNA模板中含有RNase酶将降解模板RNA，最后导致cDNA产物的量少甚至无cDNA产物。
2. 模板的纯度：若RNA模板中含有蛋白、盐离子、EDTA、乙醇、酚等杂质，将影响逆转录酶的活性，最后影响逆转录结果。
3. 模板的加量：上述操作步骤适用于模板RNA量为50 ng-2 μg ，如果模板RNA的量大于2 μg ，请按比例扩大反应体系。

注意

1. 若后续实验为实时荧光定量PCR，逆转录产物的加量应不超过PCR体系终体积的1/10，例如50 μl 的PCR反应体系，逆转录产物的加量应不超过5 μl 。
 2. 将逆转录产物置于冰上，再进行后续PCR反应；如果需要长时间保存，请置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。
-