

版本号: KR160815

FastKing RT Kit (With gDNase)

FastKing cDNA第一链合成试剂盒

(去基因组)

目录号: KR116

产品内容

| 产品组成 | KR116-01 (25 rxn) | KR116-02 (100 rxn) | KR116-03 (1000 rxn) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| 5×gDNA Buffer | 50 µl | 200 µl | 10×200 µl |
| FQ-RT Primer Mix | 50 µl | 200 µl | 10×200 µl |
| FastKing RT Enzyme Mix | 25 µl | 100 µl | 10×100 µl |
| 10×King RT Buffer | 50 µl | 200 µl | 10×200 µl |
| RNase- Free ddH ₂ O | 1 ml | 2×1 ml | 10×2×1 ml |

储存条件

该试剂盒使用干冰运输, -20°C可保存一年。

产品简介

FastKing cDNA第一链合成试剂盒是一种高效、稳定、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FastKing RT Enzyme，是通过分子改造后的新型反转录酶，特别增加了疏水motif，具有更强的RNA亲和性和热稳定性，从而进一步提高了其反转录效率和反应速率，42°C、15 min即可完成cDNA第一链的合成。另外，由于新型酶与RNA亲和力的增强，使其在通读GC含量高，二级结构复杂的RNA模板和抗逆性等方面的表现也更为的突出。

产品特点

- 反转录效率高：反转录效率可达95%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；
- 样品普适性高：对不同物种来源及杂质较多的RNA模板的适用性高；
- 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RT-PCR；cDNA文库构建；SAGE（基因表达连续分析）；引物延伸。

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5 min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×King 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

| 试剂 | 使用量 |
|-------------------------------|----------|
| 10×King RT Buffer | 2 μl |
| FastKing 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：以下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 $^{\circ}\text{C}$ 。
-