

版本号: KR170801

InRcute IncRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (With gDNase)

InRcute IncRNA cDNA第一链合成试剂盒 (去基因组)

目录号: KR202

产品内容

产品组成	KR202-01 (25 rxn)	KR202-02 (100 rxn)
5 × gDNA Buffer	50 μl	200 μl
InR-RT Primer Mix	50 μl	200 μl
InR RT Enzyme Mix	25 μl	100 μl
10 × InR 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°C可保存一年。

产品简介

InRcute lncRNA cDNA第一链合成试剂盒是专门针对长链非编码RNA (lncRNA) 反转录而开发的产品。与mRNA相比，lncRNA具有丰度低、GC含量差异大、二级结构更复杂等特性，传统反转录试剂对lncRNA难以达到理想的效果。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RNA样品中残留的基因组DNA，可有效避免残留的基因组DNA对后续PCR检测结果的干扰。本试剂盒中InR RT Enzyme Mix中使用的反转录酶为FastKing RT Enzyme，此酶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，且反转录长度至少可达10 kb。另外，新型酶与RNA亲和力的更强，配合特殊优化过的缓冲体系和引物体系，使本试剂盒在通读GC含量高，二级结构复杂，低丰度的RNA模板和抗逆性等方面表现突出，特别适合表达水平相对较低，二级结果相对复杂的lncRNA的反转录反应。

产品特点

性能卓越：反转录效率可达95%以上，Total RNA最低检测下限可达10 ng，反转录长度可达10 kb以上。

简单快速：反应体系配制简单，21 min完成lncRNA cDNA第一链的合成；

适用广泛：能够通用于GC含量差异大，二级结构复杂，低丰度的RNA模板；对不同物种来源及杂质较多的RNA模板的适用性高；

兼容性好：后续配合荧光定量检测产品，灵敏度高、稳定性好。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 下列操作步骤适用于模板量为10 ng-2 µg的Total RNA，如果Total 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. 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，然后再进行下一步操作。
 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. 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。
-

操作步骤

使本试剂盒快速合成lncRNA第一链cDNA

10 ng-2 μg Total RNA可建立20 μl 反应体系，具体过程如下所示：

- 1、将模板RNA在冰上解冻；5 \times gDNA Buffer、InR-RT Primer Mix、10 \times InR RT Buffer、RNase-Free ddH₂O在室温（15-25 $^{\circ}\text{C}$ ）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。

注意：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 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA	-	10 ng-2 μg
5 \times gDNA Buffer	2 μl	1 \times
RNase-Free ddH ₂ O	补至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

试剂组分	体积	终浓度
10 \times InR RT Buffer	2 μl	2 \times
InR RT Enzyme Mix	1 μl	-
InR-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，充分混匀后即完成20 μl 反应体系。
- 5、42 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育15 min。
- 6、95 $^{\circ}\text{C}$ ，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

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

1. 模板的完整性：模板RNA的完整性对反转录非常重要，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，将影响反转录酶的活性，最后影响反转录结果。
3. 模板的加量：上述操作步骤适用于模板RNA量为10 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，反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，反转录产物的加量应不超过5 μl。
 2. 反转录结束后，请将反转录产物置于冰上，再进行后续PCR反应配制；如果需要长时间保存，请置于-20℃。
-