

## M5 HiPer IncRNA cDNA Synthesis Kit with gDNA remover

### IncRNA cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组) 使用说明书

MF880-01 50 次

**备注：本试剂盒须与 M5 HiPer IncRNA 荧光定量检测试剂盒 (MF881) 配套使用。**

运输温度：0 °C以下

保存温度：-20 °C

IncRNA cDNA 第一链合成试剂盒是针对长链非编码 RNA (lncRNA) 逆转录而专门优化的产品。该试剂盒使用第一代高效 CrgScript II Reverse Transcriptase，配合特殊优化过的缓冲体系和引物体系，使得丰度相对较低且二级结构更复杂的 lncRNA 的逆转录效果得到极大提升。本试剂盒中的 gDNA remover 可高效去除 RNA 样本中残留的基因组 DNA，有效避免残留的基因组 DNA 对后续 PCR 检测结果的干扰。

试剂盒中使用的 CrgScript II Reverse Transcriptase 是最新一代耐热高效逆转录酶，具有极强逆转录活性和 50°C 热稳定性，可获得长至 15kb 的 cDNA 产物。该酶可对极低含量的目的 RNA 进行有效逆转录，在通读高 GC，复杂二级结构，以及低丰度的 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，二级结构相对复杂的 lncRNA 的逆转录反应。

本试剂盒附赠的 2×LncR SYBR QPCR Mixture 可直接配套用于后续的 QPCR 检测，若还需要更多的 QPCR 检测，请选购 IncRNA 荧光定量检测试剂盒。

#### 试剂盒产品组分

产品组分	50T
5×LncR RT superMix	200 μl
LncR-RT Primer	50 μl
gDNA remover	50 μl
RNase-Free H <sub>2</sub> O	1.5 ml

#### 操作步骤

所有操作必须用 RNase-free 的一次性耗材(枪头,离心管等),并最好在处理 RNA 的专门环境进行。小心操作,避免 RNase 污染。将逆转录需用试剂拿至室温完全融化,并多次颠倒混匀,短暂离心后置于冰上或 4°C 备用。

1. 去除 gDNA。在 RNase-free 微量离心管中按下表配制 gDNA removal 反应体系。

模板 RNA *	10 ng ~ 1.5 μg
gDNA remover	1 μl
RNase-Free H <sub>2</sub> O	补足 15 μl

\* RNA 浓度允许时,一般建议 20 μl 逆转录体系加 0.2-1 μg 的总 RNA,可获得很好的逆转录效果。

混匀后进行 gDNA removal 反应。用 PCR 仪进行反应的条件设定,为: 37°C, 5 min; 4°C 维持; 热盖关闭。

2. 逆转录反应。步骤1反应结束后,从PCR仪上拿下反应管,按下表向每管gDNA removal反应体系中补充完整的逆转录体系。

步骤 1 的反应液	15 μl
5×LncR RT superMix	4 μl
LncR-RT Primer *	1 μl

\* 也可选择用靶序列特异引物进行逆转录。特异引物浓度建议 10-20μM, 20ul 体系加 1μl。

用移液器吹吸混匀反应体系后，进行逆转录反应。用PCR 仪进行反应的条件设定为：**50°C, 15 min; 90°C, 1 min; 4°C维持; 热盖开启**。若目标lncRNA 二级结构复杂，可尝试如下条件：**65°C, 2 min; 50°C, 15 min; 90°C, 1 min; 4°C维持; 热盖开启**。

**若 RNA 样本很纯，不需要做去除 gDNA，可直接按如下步骤进行快速逆转录即可。**

1. 按下表在 RNase-free 的微量离心管中混合反应体系：

5×LncR RT superMix	4 μl
模板 RNA 1*	10 ng ~ 1.5 μg
LncR-RT Primer 2*	1 μl
RNase-Free H <sub>2</sub> O	补足 20 μl

1\* RNA 浓度允许的情况下，20 μl 体系建议 0.2-1 μg 的总 RNA。

2\* 也可选择用靶序列特异引物进行逆转录。特异引物浓度建议 10-20 μM，20 μl 体系加 1 μl。

2. 用移液器吹吸混匀反应体系后，进行逆转录反应。用PCR 仪进行反应的条件设定为：**50°C, 15 min; 90°C, 1 min; 4°C维持; 热盖开启**。

若目标 lncRNA 二级结构复杂，可尝试如下条件：**65°C, 2 min; 50°C, 15 min; 90°C, 1 min; 4°C维持; 热盖开启**。

3. 反应结束后的cDNA 产物-20°C长期保存。进行后续qPCR 检测时，建议将cDNA 产物做2-10 倍稀释后再进行检测。

未稀释 cDNA 作为模板的用量不要多于 QPCR 反应体积的 1/10，以免抑制 PCR 反应。