

M5 Super qPCR RT kit

一管化的反转录试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Super qPCR RT kit	50T	MF012-T
M5 Super qPCR RT kit	200T	MF012-01
M5 Super qPCR RT kit	2x200T	MF012-02

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步实验设计的超高灵敏度 RT-PCR 反应系统,可以从极低量的总 RNA 或 poly(A) mRNA 合成第一链 cDNA,并能够通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板。该试剂盒使用聚合美特制的 M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RTase),该 RTase 通过多点定点突变去除了 RNase H 的活性 (RNase H-),并增加了 RTase 酶与模板-引物之间的亲和力,具有更好的热稳定性,因此其聚合酶的活性和持续合成能力均高于野生型的 M-MuLV RTase,合成的 cDNA 产量更高,长度可达 15 kb。另外,本产品将引物配比、反转录酶和 RNase 抑制剂优化成 mix 形式,精简了试剂盒组成,非常简便操作,而且对后续 Realtime PCR 反应体系影响也降到最低。

【产品特点】

- 1) 方便快捷: mix 配制,组分更少,操作更快;反转录只需 15min 就可以完成。
- 2) 超强对后续 qPCR 反应适用性: 通过组分和 Buffer 优化,使带入到后续 qPCR 反应的反转录反应液的影响降到最低。
- 3) 高灵敏度: 对极少量的 RNA 模板也可以进行良好的反转录反应。

【产品组分】

	MF012-50T	MF012-200T
5x M5 RT Super Mix*	100 μ l	400 μ l
5x M5 RT Super Mix Control**	10 μ l	40 μ l
DEPC-ddH ₂ O	0.5 ml	2x1 ml

* 5x M5 RT Super Mix: 由 M5 M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase inhibitors, Oligo dT primer, Random Primer, Buffer, dNTPs 等构成的 Mix 形式。打开盖子前,请先离心,使液体落在离心管底部后再使用。另外,本试剂粘度很高,请小心使用移液器。

**5x M5 RT Super Mix Control: 该组分是 5x M5 RT Super Mix 去除了 M5 M-MuLV Reverse Transcriptase 的 mix,可以用于反转录的对照。打开盖子前,请先离心,使液体落在离心管底部后再使用。另外,本试剂粘度很高,请小心使用移液器。

【活性定义】

以 poly(rA)为模板, oligo(dT)为引物,在 42°C 条件下,10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 所需要的酶量定义为一个活性单位(U)。

【注意事项】

1. 实验过程中请全程注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂,使用之前请完全溶解并充分混匀,以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用,因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用 M5 Total RNA Extraction Reagent (TRIgent) (货号 MF034-01) 制备高质量的 RNA 模板,并设置反转录反应阳性对照。

4. 由于所有的 RNA 提取方法都不能完全去除基因组 DNA, 所以应根据后续实验的需求, 选择是否需要在反转录反应前去除残留基因组 DNA。RNase-free DNase I 处理的具体方法见本说明书附录。
5. M5 M-MuLV RTase 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA, 其起始位点由所用引物所决定:
 - 1) 随机引物 (Random Primer) 在 RNA 模板上没有特异性结合位点, 所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板;
 - 2) Oligo dT Primer 只能以 poly(A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板;
 - 3) 采用序列特异性引物 (Gene Specific Primer) 以其结合位点为起始位点。
6. M5 M-MuLV RTase 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
7. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板, 合成含各种标记的 cDNA, 作为杂交实验的探针。
8. RNA 可置于-70°C 以下长期保存, cDNA 合成产物可置于-20°C 保存。

【操作流程】

1. RNA 通常具有复杂的二级结构, 为了获得更高的合成效率, 将 RNA 模板 65°C 孵育 5 分钟, 以打开 RNA 的二级结构。
2. 然后立即放入冰浴 2min。
3. 在冰上加入下列成分 (可根据需要, 扩大反应体系):

5x M5 RT Super Mix	2 μ l
RNA 模板	0.01~1 μ g
DEPC-ddH ₂ O	补足至 10 μ l

进行反转录阴性对照时, 可用 5x M5 RT Super Mix Control 代替 5x M5 RT Super Mix, 可以确认信号是否来自 cDNA。

4. 轻轻混匀, 短暂离心; 37°C 孵育, 15min; 50°C 孵育, 5min (可选)。
5. 96°C 加热 5 分钟使酶失活;
6. 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

【补充说明】

以下流程为选做步骤, 请根据实验情况酌情选择。

1. RNase-free DNase I 处理 RNA 模板的方法:

- 1) 在 DNase, RNase-free 离心管中加入下列试剂:

RNA 样品	2-5 μ g
10 \times DNase I Buffer	1 μ l
DNase I (2 U/ μ l)	0.5 μ l
RNase Inhibitor	0.25 μ l
DEPC-ddH ₂ O 补足至	10 μ l

- 2) 混匀, 短暂离心, 37°C 放置 30 分钟;
- 3) 加入 1 μ l 50 mM EDTA, 65°C 放置 15 分钟使 DNase I 失活;或者直接使用酚/氯仿抽提去除 DNase I;
- 4) 为避免干扰反转录体系, RNA 加入量最好不超过反转录体系的 1/5, 如果 RNA 浓度过低, 建议沉淀浓缩后使用。

2. 去除第一链 cDNA 合成产物中的 RNA 方法:

- 1) 加入 0.5 μ l RNase H, 混匀, 30°C 反应 20 分钟, 70°C 放置 20 分钟;
- 2) 取 5 μ l RNase H 处理的 cDNA, 加入 95 μ l ddH₂O (即稀释 20 倍);
- 3) 取 2 μ l 稀释后的 cDNA 作为模板用于 PCR 扩增。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。