



EX 5×RT MasterMIX

目录号:ZR105

保存条件:该试剂盒使用干冰运输, -20°C可保存一年。

产品组成:

	ZR105-1 (25 rxn)
EX 5×RT MasterMIX	50 μ l
RNase- Free ddH ₂ O	1 ml

LOT#60C03A

产品简介:

EX 5×RT MasterMIX是一种高效、快速反转录系统。本试剂将所有反转录试剂混合到一管中,使用中仅仅需要加入RNA和水即可;并且本高效反转录酶mix, 42°C, 15 -20min即可完成cDNA第一链的合成。

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, 15-20 min完成cDNA第一链的合成;

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 μ g的总RNA, 如果总RNA量大于2 μ g, 请按比例扩大反应体系。OD检测受多个因素影响, 建议务必跑普通琼脂糖电泳检测。
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。优先使用推荐方法。
4. 反转录体系可以根据需要相应扩大。



操作步骤:

1. 将模板RNA在冰上解冻:

试剂盒在室温(15-25°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。

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. 反转录(10ul反转录体系)

组成成分

使用量

Total RNA/mRNA	50 ng-2 μ g/ 5-500 ng
EX 5 \times RT MasterMIX	2 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	x μ l
Total Reaction Volume	10 μ l

充分混匀。简短离心,并置于25°C,孵育10min,之后,于42°C,孵育15min。

注:用于荧光定量建议42°C,孵育15min。

用于普通PCR(大片段)建议42°C,孵育50min。

3. 85°C, 孵育5 min终止反转录。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 μ g,如果模板RNA的量大于2 μ g,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 μ l的PCR反应体系,逆转录产物的加量应不超过5 μ l。推荐1-2 μ l。
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°C。