

All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix (with dsDNase)

REF: EG15133S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix	400 µl
dsDNase	2×50 µl
10× dsDNase Buffer	200 µl
Nuclease-Free Water	2×1 ml

产品简介

All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix (with dsDNase) 是一款高效、便捷、减少污染的高质量一链 cDNA 合成试剂盒，包含热稳定的 M-MLV GIII Reverse Transcriptase 及其反应 Buffer、RNA 酶抑制剂、dNTPs、Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物等一链 cDNA 合成所需的所有组分，仅需加入 RNA 模板和水即可开始反应。使用该逆转录试剂盒获得的 cDNA 主要用于下游 qPCR 实验。

从细胞中提取的 RNA 往往存在基因组 DNA 污染，如果逆转录前不将其去除，下游 qPCR 反应时基因组 DNA 与 cDNA 会同时被扩增（尤其当引物设计在同一外显子上时），从而影响基因表达定量准确性。本试剂盒采用 dsDNase 高效去除基因组 DNA 污染，dsDNase 能够特异性消化双链 DNA（dsDNA 或 DNA-RNA 杂合链中的 DNA 链），并且具有热敏感性，在逆转录温度下即可快速不可逆地失活。与传统使用 DNase I 去除基因组 DNA 污染的方法相比，dsDNase 无需额外加入 EDTA 进行失活，不仅节省实验时间，而且降低了对逆转录反应的抑制。

可依据基因组污染严重程度选择采用去基因组 DNA 污染与逆转录分开进行的操作方法，或者去基因组污染与逆转录一步法进行的操作方法。

使用方法

1. 针对基因组 DNA 含量低的 RNA 样品（推荐方案）

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
模板 RNA ^a	50 ng~1 µg
All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix	4 µl
dsDNase	1 µl
Nuclease-Free Water	To 20 µl

a. 推荐使用试剂盒提取的高质量 RNA 作为模板。

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 37°C 温育 2 min，以去除基因组 DNA 污染；

④ 55°C 温育 15 min；

⑤ 反应结束后，85°C 温育 5 min 以终止反应；

⑥ 迅速将获得的 cDNA 置于冰上，用于后续实验；或立即保存于 -20°C。

2. 针对基因组 DNA 含量高的 RNA 样品

(1) 基因组 DNA 污染去除

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
模板 RNA ^a	50 ng~1 µg
dsDNase	1 µl
10× dsDNase Buffer	1 µl
Nuclease-Free Water	To 10 µl

a. 推荐采用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 37°C 温育 2 min，以去除基因组 DNA 污染；

注：若 RNA 中基因组 DNA 污染严重，可适当延长 37°C 温育时间至 5 min。

④ 65°C 温育 2 min，使 dsDNase 失活，冰上放置。

(2) 第一链 cDNA 合成

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量（实验组）
“实验 (1)” 反应产物	10 µl
All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix	4 µl
Nuclease-Free Water	To 20 µl

② 轻柔吸打混匀，瞬离；

③ 50°C 温育 15 min；

注：若目标 RNA 不含 Poly(A) 结构，可预先 25°C 温育 10 min。

④ 反应结束后，85°C 温育 5 min，以终止反应；

⑤ 将获得的 cDNA 溶液置于冰上，用于后续实验。

注：cDNA 溶液置于 -20°C 储存，建议不超过 1 周；置于 -80°C 可长期储存。

注意事项

预混液中已经包含 Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物，不仅适用于包含 Poly(A) 结构的真核生物 mRNA，也适用于不含 Poly(A) 结构的原核生物 RNA、真核生物 rRNA 和 tRNA 等模板，但不适用于 miRNA 等小 RNA 模板。

由于随机引物会在 RNA 任意位置开始逆转录，因此不建议使用本产品进行真核生物全长 cDNA 克隆。如需获得真核生物的全长 cDNA，建议使用 RTase III Primer Flexible All-in-One Mix (EG20133)。