

NG Script I cDNA Synthesis Kit (with gDNA)

货号: NG047S 100T

NG047M 200T

储存条件: -20°C.

Components	100 T	200 T
4 × gDNase buffer	400 µl	800 µl
5 × NG Script I Mix	400 µl	800 µl
5 × No RTase Mix* (对照组)	40 µl	80 µl
Water nuclease-free	1 ml	1.5 ml

制品说明:

本产品是一种高效、稳定、快速并可以去除基因组 DNA 污染的反转录系统。试剂盒采用分子进化技术多点突变的新一代反转录酶，大幅度提高了稳定性和反转录效率。本试剂盒为一管式反转录预混 Mix，5 × NG Script I Mix 中含有反转录第一链合所需的所有试剂 (NG Script I H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer)。通常 Real Time RT-PCR 等实验需要先用 DNase I 消化去除 RNA 中残留的基因组 DNA，本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 4 × gDNase buffer 2 分钟消除残留基因组 DNA，不需要 DNase 消化和后续繁琐步骤。

适用范围: 第一链 cDNA 合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

产品特点:

- 新一代反转录酶大幅度提高了稳定性和反转录效率。
- 采用 gDNA Eraser 仅需 2 分钟清除 DNA 残留，无需 DNase 消化和后续繁琐步骤。
- 一管式全预混的反转录 Mix，只需加入 RNA 和水，
- 本产品针对 qPCR 进行特别优化 oligo dT 和 N6 随机引物配比，使 cDNA 合成可从 RNA 转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率，最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。

操作步骤:

(以 20 µl 反应体系为例，也可以采用 10 µl 反应体系)

- 将模板 RNA 和 5 × NG Script I Mix 在冰上解冻；4 × gDNase buffer 和 Water nuclease-free 在室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
- 在 RNase free 管里面加入以下成分：(建议使用 PCR 管冰上配制)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 12 µl *
4 × gDNase buffer	4 µl (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 16 µl (补足到总体积 16 µl)

* Total RNA 建议不超过 2 µg，mRNA 不超过 200 ng (20 µl 体系)

- 移液器轻轻吹打混匀，42°C 孵育 2 分钟 (或者 37°C 孵育 5 分钟)。控温步骤均建议 PCR 仪器上进行。
- 继续直接在同一管加入如下成份：

Components	Volume
5 × NG Script I Mix	4 µl (见注意事项 3)

- 移液器轻轻吹打混匀 (总体积 20 µl)

注: 如使用 mRNA 模板是来源于真核细胞 (如人、小鼠的组织细胞) 含有 Poly(A) 尾结构，42°C 孵育 15-20min。

如使用 mRNA 模板是来源于原核细胞 (细菌) 或者病毒等不含 Poly(A) 尾结构，25°C 孵育 10 min，42°C 孵育 15-20min。

如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域，可尝试将反应温度提高至 50°C，有助于提高产量。

- 85°C 加热 5 sec 失活 NG Script I RTase 和 4 × gDNase buffer
- 得到的 cDNA 产物可立即用于 qPCR 反应，或在 -20°C 保存，并在半年内使用；

RT-qPCR

取适量反转录 cDNA 产物（一般不超过 qPCR 反应体积的 1/10）作为 qPCR 模板，按照厂家荧光定量 PCR 试剂说明书进行下一步荧光定量 PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释 cDNA 模板使用。

注意事项:

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 4× gDNase buffer、5 × NG Script I Mix 非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。

