

特点:

本产品使用了添加HL dsDNase (热敏双链特异性核酸酶)的预混体系,反应时只需加入RNA模板、引物和RNase Free H₂O,即可合成第一链cDNA的同时,去除RNA模板中残留的基因组DNA污染 (gDNA≤100 ng)。反应结束后85°C加热5min,即可灭活转录酶和HL dsDNase。

5×Polestar RT MasterMix (with dsDNase)预混体系包含RNase H活性缺失的反应Buffer、HL dsDNase、dNTP、RNase Inhibitor和Polestar MLV Reverse Transcriptase。Polestar MLV Reverse Transcriptase去除了RNase H活性,避免了反转录过程中RNA的降解,其热稳定性也大大增加,可在55°C高温条件下进行高效的转录反应。本产品对复杂RNA模板的转录效率,转录产物的长度和产量的表现均优于同类产品。

应用:

有效反转录mRNA、tRNA、LncRNA、ncRNA,合成的第一链cDNA可广泛用于2nd Strand的合成、杂交、PCR扩增、Real-Time PCR反应等。操作简便,尤其适用于定量PCR检测。

试剂盒组成:

组分	100T
5×Polestar RT MasterMix(with dsDNase)	400 μL
20×Oligo dT ₍₂₅₎ &Random Primer	100 μL
RNase Free H ₂ O	1 mL × 2

储存:

-20°C可保存3年;避免反复冻融。

注: 5×Polestar RT MasterMix (with dsDNase) 如出现沉淀属正常现象,可融化后混合均匀使用不影响后续实验效果。

步骤:
1. 按以下组分配制反转录反应液

Total RNA or Poly(A) RNA	0.1~2 μg
5×Polestar RT MasterMix(with dsDNase)	4 μL
*20×Oligo dT ₍₂₅₎ &Random Primer	1 μL
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 μL

*注: 反转录引物可根据需要改用特异性引物。

2. 根据实际情况反转录可选择快速程序或标准程序

快速程序:

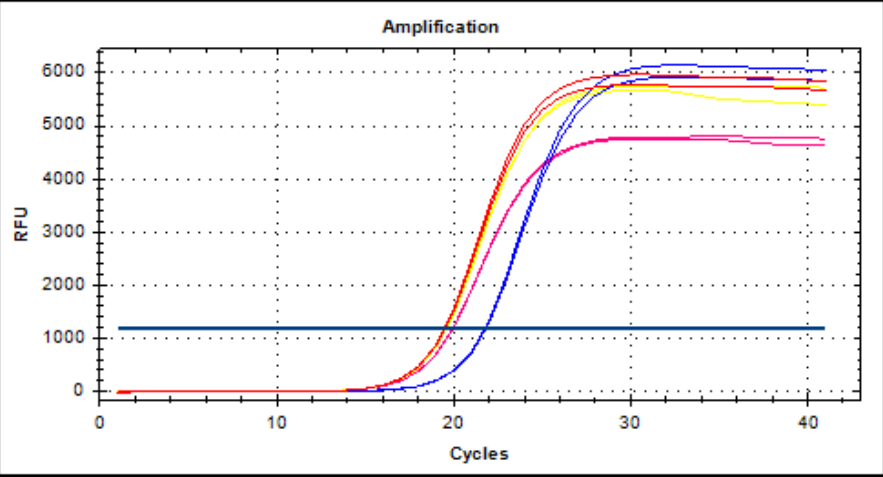
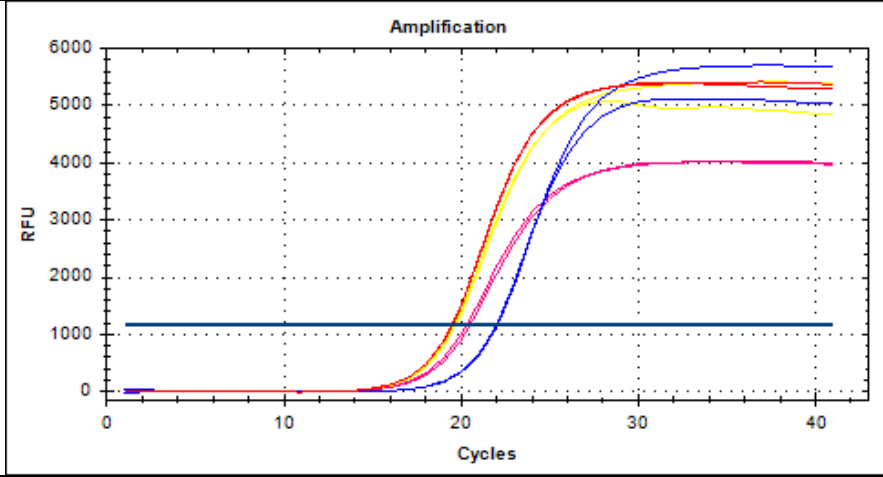
37°C	15~30min (cDNA合成)
85°C	5min (失活MLV)

标准程序:

25°C	10min (引物配对)
55°C	30~60min (cDNA合成)
85°C	5min (失活MLV)

注: 使用快速程序进行反转录时,反转录效率>80%,可用于定量PCR试验;

转录高GC含量、含复杂二级结构、长片段的模板建议使用标准程序(反转录效率≈100%),可达到更好的试验效果。

		同一外显子上、下游引物扩增情况		跨外显子上、下游引物扩增情况	
扩增曲线					
品牌		■ 国内品牌N	■ 国内品牌Q	■ Tiosbio	■ 进口品牌T
操作步骤	预变性	无	无	无	1μg总RNA 65°C 5min, 冰上急速冷却;
	基因组DNA去除	1μg总RNA 加入4μL 4×gDNA wiper Mix, 补足H ₂ O至16μL, 42°C 2min;	1μg总RNA加入4μL 5×EasyScript All-in-one SuperMix for qPCR, 1μL gDNA Remover补足水至20μL, 42°C 15min;	1μg 总 RNA 加入 4μL 5×Polestar RT MasterMix(with dsDNase)和1μL 20×Oligo dT(25) & Random Primer, 补足水至20μL, 37°C 15 min;	同一管内再加入4μL 4×DN Master Mix*, 补足H ₂ O至16μL, 37°C 5min;
	反转录	同一管内再加入4μL 5×HiScript II qRT SuperMix II, 50°C 15min;			同一管内再加入4μL 5×RT Master Mix II, 37°C 15min, 50°C 5min;
	酶失活	85°C 5sec;	85°C 5sec;	85°C 5min;	98°C 5min, 4°C 保存。
反应时间	≥17 min 5 sec	≥15 min 5 sec	≥20 min	≥30 min	
加样次数	2	1	1	3	

*初次使用需要进行4×DN Master Mix与gDNA Remover的混合。

后续实时定量PCR试验效果: 与多个品牌相比, Tiosbio® Polestar 1st cDNA Synthesis Kit (gDNA removal)在反应时间、操作步骤和转录效率多个方面均表现卓越。使用Polestar 1st cDNA Synthesis Kit (gDNA removal)可获得与进口品牌T完全相同的Ct值, 但反应时间比进口品牌T缩短了1/3, 且操作更为简便, 试验操作避免了再次开盖加样, 大幅降低了因操作引入污染的可能; 与操作时间最短和操作步骤最少的国内品牌Q相比, Tiosbio的反应时间虽然增加了5min, 但是转录效率显著提高, Ct值比国内品牌Q减少约2个循环; 与国内品牌N相比, Tiosbio可减少一步加样步骤, 但对基因组降解效果更好(使用不同引物的扩增Ct值完全一致)。