



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室

ATGScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)

R112



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品组成	1
储存条件	1
质量控制	2
实验方案	2
注意事项	5

产品简介

ATGScript® Reverse Transcriptase 是在 M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase 基础上经过饱和定点突变得到的全新逆转录酶。经过热点突变, ATGScript® Reverse Transcriptase 具有更高的热稳定性, 使其可用于具有二级结构或 GC 含量较高的 RNA 模板的逆转录, 并可获得更多全长的 cDNA。并且 ATGScript® Reverse Transcriptase 的错配率比 M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase 大幅降低, 提高了克隆的保真度。通过优势组合突变增强了其与模板的亲合力, 特别适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录。

ATGScript® 第一链 cDNA 合成试剂盒基于 ATGScript® Reverse Transcriptase, 包含合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分, 适合于后续的 PCR、qPCR 以及 PCR 克隆。产品中的 4 × gDNA wiper Mix 可彻底去除残留的基因组 DNA 污染, 保证后续定量结果更加可靠; 5 × ATGScript® RT Mix 包含优化的缓冲体系和 dNTP; Enzyme Mix 包含 ATGScript® Reverse Transcriptase 和 RNasin。可根据需要, 选择 Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers 或基因特异引物作为逆转录引物。

产品组成

组分	R112 (100 rxns) (20 µl/rxn)
RNase-free ddH ₂ O	2 × 1 ml
5 × ATGScript® RT Mix ^{*1}	400 µl
ATGScript® Enzyme Mix ^{*2}	200 µl
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 µM)	100 µl
Random hexamers (50 ng/µl)	100 µl
4 × gDNA wiper Mix	300 µl

*1. 包含 1 mM each dNTP

*2. 包含 RNasin (ATG #RR101)、耐高温逆转录酶 ATGScript® Reverse Transcriptase

储存条件

-20°C保存, 于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

质量控制

核酸外切酶残留检测：

20 U 本品和 0.6 μg λ -HindIII 在 74°C 下孵育 1 h，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：

20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λ DNA，37°C 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：

20 U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：

50 μl 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

功能检测：

以 1 μg 总 RNA 为模板，Oligo (dT)₂₃VN 为引物，42°C 反应 45 min。取 1/10 cDNA 产物进行 PCR 扩增 VIN 基因。琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，可见有单一的 4.6 kb 条带。

实验方案

后续实验为 PCR

(1) RNA 模板变性

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

组分	用量
RNase-free ddH ₂ O	to 9 μl
Total RNA or Poly A* RNA	(10 pg ~ 5 μg) or (10 pg ~ 500 ng)

65°C 加热 5 min，迅速置于冰上骤冷静置 2 min。短时离心数秒后，进行后续配制。

*RNA 模板变性有助于打开二级结构，提高逆转录效率。对于长度超过 3 kb 的 cDNA 片段，此变性步骤不可省略。

(2) 基因组 DNA 去除

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

组分	用量
上一步混合液	9 μl
4 \times gDNA wiper Mix	3 μl

用移液器轻轻吹打混匀，42°C 孵育 2 min。

(3) 配制第一链 cDNA 合成反应液

组分	用量
上一步的混合液	12 μ l
5 \times ATGScript [®] RT Mix	4 μ l
ATGScript [®] Enzyme Mix	2 μ l
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 μ M) or Random hexamers (50 ng/ μ l)	1 μ l
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

*该方案也适用于基因特异性引物 (GSP) 引发的逆转录, 为避免 gDNA wiper 对 GSP 的潜在影响, 请在该步骤体系中加入 GSP 2 pmol。

(4) 按下列条件进行第一链合成反应

若使用 Oligo (dT)₂₃VN

温度	时间
42°C*	45 min*
85°C	5 min

若使用 Random hexamers

温度	时间
25°C	5 min
42°C*	45 min*
85°C	5 min

若使用 Gene Specific Primers

温度	时间
50°C*	45 min*
85°C	5 min

* 温度可调范围 42 ~ 70°C, 时间可调范围 15 ~ 60 min。调整温度, 延长逆转录时间可能有助于获得更长的 cDNA (>5 kb), 提高产量。

后续实验为 qPCR

(1) 基因组去除

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

组分	用量
RNase-free ddH ₂ O	to 12 μ l
4 \times gDNA wiper Mix	3 μ l
Total RNA or Poly A RNA	(10 pg ~ 1 μ g) or (10 pg ~ 100 ng)

(2) 配制第一链 cDNA 合成反应液

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

组分	用量
上一步混合液	12 μ l
5 \times ATGScript [®] RT Mix	4 μ l
ATGScript [®] Enzyme Mix	2 μ l
Oligo (dT) ₂₃ VN Primer (50 μ M)	1 μ l
Random hexamers (50 ng/ μ l)	1 μ l

(3) 按下列条件进行第一链合成反应

温度	时间
42°C*	15 min*
85°C	5 min

产物可立即用于 qPCR 反应, 或在 -20°C 保存, 并在半年内使用; 长期存放建议分装后在 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

*对于 RNA 模板具有复杂二级结构或 GC 含量较高, 可将温度调整至 50 ~ 60°C, 时间可延长至 25 min。

注意事项

引物选择：

后续实验为 PCR

- (1) 如果模板为真核生物来源，一般情况下首选 Oligo (dT)₂₃VN，与真核生物 mRNA 的 3' Poly A 尾配对，可获得最高产量的全长 cDNA。
- (2) 基因特异性引物 (GSP) 的特异性最高。但有些情况下，用于 PCR 反应的 GSP 无法有效引导第一链 cDNA 合成。这时，可改用 Oligo (dT)₂₃VN 或 Random hexamers 重新进行逆转录。
- (3) Random hexamers 特异性最低，所有 RNA，包括 mRNA，rRNA，tRNA 均可以作为 Random hexamers 的模板。当目标区域具有复杂二级结构或 GC 含量较高，或者模板为原核生物来源，使用 Oligo (dT)₂₃VN 或基因特异性引物 (GSP) 无法有效引导 cDNA 合成时，可使用 Random hexamers 为引物。

后续实验为 qPCR

将 Oligo (dT)₂₃VN 与 Random hexamers 混合使用，可使 mRNA 的各个区域 cDNA 合成效率相同，有助于提高定量结果的真实性和重复性。