



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
订货 e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

BeyoRT™ III cDNA试剂盒(with gDNA EZeraser)

产品编号	产品名称	包装
D7180S	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	20次
D7180M	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	100次
D7180L	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	500次

产品简介:

- 碧云天生产的 BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒(with gDNA EZeraser), 即 BeyoRT™ III First Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA EZeraser, 是一种同时提供了快速高效去除基因组 DNA 污染的 gDNA EZeraser 和 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)的反转录试剂盒。加入 gDNA EZeraser 后仅需在 37 ℃ 加热 2 分钟, 就能有效去除基因组 DNA 污染, 后续无需任何额外步骤, 仅需加入水和 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)就能进行反转录的非常简单、便捷、快速、稳定并且非常高效的 cDNA 第一链合成试剂盒。本产品对于 3kb 以下片段, 10min 就能完成反转录; 产物长度可以长达 12kb; 可以在 55 ℃ 进行高温反转录, 有效解决复杂二级结构 RNA 反转录难的问题; 预混液(5X)在-20 ℃ 不会结冻, 取用非常便捷。
- 本试剂盒中的 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)包含了经过改造和优化的快速高效(短至 10min 完成反转录)、热稳定(高达 55 ℃)、高精度度、产物超长(长达 12kb)的 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶、RNase Inhibitor、Oligo(dT)₁₈ Primer、Random Hexamer Primer、dNTPs、MgCl₂ 和反转录反应缓冲液, 只需加入 RNA 模板和水(DEPC-treated Water 或 DNase/RNase-Free Water) 就能进行反转录反应, 大大简化了反转录的实验操作, 使操作最为便捷, 能有效避免常规反转录非常复杂的操作过程中可能导致的操作误差、孔间污染等, 使反转录的重复性和平行性大幅提升。
- 本产品可广泛用于获得总 RNA 或 mRNA 后 cDNA 第一条链的合成, 后续可以用于 PCR、real-time PCR 也称定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)、cDNA 的第二链合成以及 cDNA 文库的构建, 尤其是反转录所得目的基因的克隆等。BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒(with gDNA EZeraser)还可以通过反转录用于 DNA 探针的荧光、生物素、地高辛或同位素标记等, 也可以通过引物延伸(primer extension)来分析和研究 RNA。
- 本产品中的 gDNA EZeraser 其主要有效成分为热敏性 dsDNase (Thermolabile dsDNase), 能特异性地降解双链基因组 DNA, 效率高, 作用时间短, 在充分去除残留基因组 DNA 之后不会对 cDNA 造成显著影响。热敏性 dsDNase 加入本试剂盒中的 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)就能充分抑制其活性, 并且在 55 ℃ 加热 5min 就能导致完全失去酶活性。后续如果用于常规 PCR 或 qPCR, PCR 的首次变性条件能充分失活 gDNA EZeraser, 因此不必担心 gDNA EZeraser 对于后续的常规 PCR 或 qPCR 的干扰。使用本产品可以有效避免总 RNA 中的 gDNA 对于后续 qPCR 定量的干扰。另一方面, 也有助于简化 qPCR 引物设计, 无需进行跨内含子引物设计。
- BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒(with gDNA EZeraser)中的 BeyoRT™ III M-MLV reverse transcriptase, 是一种经过改造和优化的快速高效(短至 10min 完成反转录)、热稳定(高达 55 ℃)、高精度度、产物超长(长达 12kb)的 M-MLV 反转录酶, 具有正常的依赖于 RNA 或 DNA 模板的 DNA 聚合酶活性, 能够以 RNA 或 DNA 为模板, 在引物存在的情况下进行互补 DNA 链的合成, 即可以进行 cDNA(complementary DNA)的第一链合成, 同时它保留了 RNase H 的活力, 能选择性剪切 RNA 和 DNA 杂合双链中的 RNA, 有利于后续 cDNA 第二链的合成。
- 本产品经测试可以轻松完成长度为 8 kb 及以下基因的反转录, 反转录的最大长度可以达到 12 kb。BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶热稳定性好, 反转录效率高, 最适反应温度为 42 ℃, 当温度达到 50 ℃ 时仍具有很高活性。对于长度较短的 cDNA 反转录, 温度达到 55 ℃ 时也可获得较高产量的 cDNA。高温反转录对于高 GC 含量 RNA 的反转录, 能有效减少二级结构, 提升反转录效率。反转录速度快, 6kb 以下的 cDNA 反转录只需 0.5h 即可完成, 3kb 以下的 cDNA 反转录 10min 即可完成。
- 本产品反转录效率高, BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)的反转录效率与非预混液的反转录效率一致(参考图1)。
- 如果希望进行常规的反转录操作, 可以单独选购BeyoRT™ III M-MLV反转录酶(D7176), RNase Inhibitor (R0102)和dNTP mix (D7373), 或者选购BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒(D7178)进行反转录反应。
- 本产品操作便捷, 去除基因组DNA污染仅需2分钟, 同时采用了第一链合成预混液(5X), 即反转录预混液(5X), 后续只需加入水和反转录预混液(5X), 即可快速进行反转录反应, 并且BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)在-20 ℃不会结冻, 使用非常便捷。
- 本产品重复性好, 反转录所有试剂预混合, 大大减少操作步骤, 有效降低污染几率和操作误差, 使实验结果更加一致, 重复性更好。

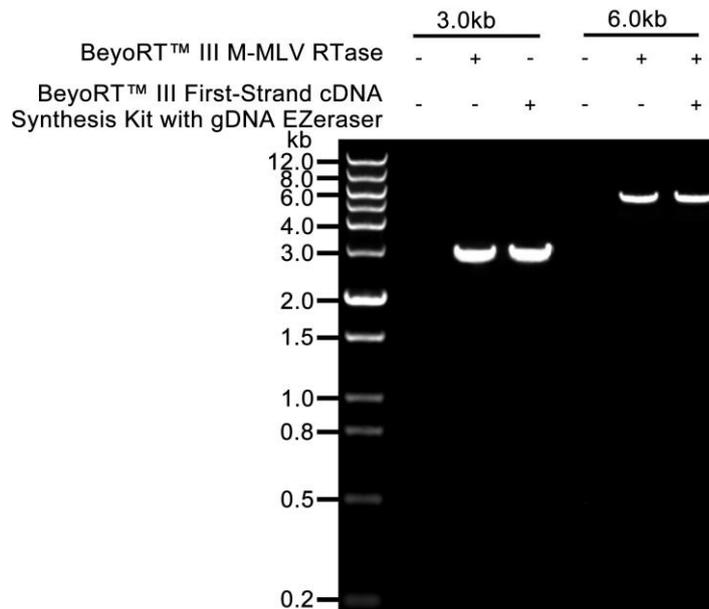


图 1. 使用碧云天的 BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒(with gDNA EZeraser)和使用 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶的常规反转录体系的效果对比图。在 20 μ l 的反转录反应体系中，以 HEK293T 细胞中提取的 1 μ g 总 RNA 为模板，没有加入反转录酶、分别使用 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶的常规反转录体系和 BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒(with gDNA EZeraser)，42 $^{\circ}$ C 反转录 60min。然后取 1 μ l 反转录产物分别进行两个目的基因的 PCR 扩增和电泳检测。

- **失活或抑制：**80 $^{\circ}$ C 孵育 10min 可以导致本产品中的 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶失活；EDTA、EGTA 等螯合剂、无机磷酸盐或焦磷酸盐以及聚氨(polyamine)对 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶有抑制作用。55 $^{\circ}$ C 孵育 5min 可以导致本产品中的 gDNA EZeraser 失活，并且本试剂盒中的 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)在反转录体系中能充分抑制 gDNA EZeraser 活性。
- 对于 20 μ l 反转录体系，本试剂盒的不同包装分别足够进行 20 次、100 次和 500 次反转录反应。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7180S-1	BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)	80 μ l
D7180S-2	gDNA EZeraser	20 μ l
D7180S-3	gDNA EZeraser Buffer (10X)	24 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7180M-1	BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)	400 μ l
D7180M-2	gDNA EZeraser	100 μ l
D7180M-3	gDNA EZeraser Buffer (10X)	120 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7180L-1	BeyoRT™ III cDNA 第一链合成预混液(5X)	2ml
D7180L-2	gDNA EZeraser	500 μ l
D7180L-3	gDNA EZeraser Buffer (10X)	600 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C 保存。

注意事项：

- 对于 GC 含量比较高的 RNA 的反转录，产品的使用说明中给予了特别说明，请予以关注。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 去除 RNA 样品中的基因组 DNA：

- a. 将RNA样品、gDNA EZeraser Buffer (10X)、DEPC-treated Water在室温(15-25 °C)解冻, 解冻后立即置于冰上。使用前将每种溶液混匀并短暂离心以使所有液体沉降于管底。
- b. RNA的变性(可选做), 把RNA样品在65 °C条件下热变性5 min后, 立即置于冰水中冷却。经过本步骤处理后, 对于容易形成高级结构的RNA可以有效提高反转录的效率。初次实验时, 建议对于是否需要变性进行摸索。
- c. 按下表成分于冰上配制反应混合液。为了保证反应体系配制的准确性, 进行反转录反应时, 可以先配制适量 DEPC-treated Water、gDNA EZeraser Buffer (10X)和 gDNA EZeraser 的混合物, 然后分装到每个反应管中, 最后加入 RNA 样品。

试剂	使用量
DEPC-treated Water	x μ l*
gDNA EZeraser Buffer (10X)	1 μ l
gDNA EZeraser	1 μ l
RNA sample	up to 1 μ g**
总体积	10 μ l

* x μ l表示加入的体积须根据实际情况确定, 使最终体积为10 μ l。

**常规的20 μ l反转录反应体系, 可使用10pg到1 μ g的Total RNA, 建议使用0.5-1 μ g的Total RNA。

- d. 在PCR仪上或水浴中, 37 °C孵育2min。
 - e. 立即置于冰上, 或者迅速切换到55 °C孵育5min, 随后置于冰上放置。55 °C孵育5min能充分失活gDNA EZeraser, 但后续加入BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)也能充分抑制gDNA EZeraser的活性。
2. cDNA第一条链的合成(First-stand cDNA Synthesis):
- a. 每管加入6 μ l水(DEPC-treated Water)和4 μ l BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X), 总体积20 μ l。
 - b. 轻轻混匀(用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉降液体。
 - c. 42 °C孵育10-60 min。反转录3kb以下的cDNA, 反转录10min即可, 反转录3-6kb的cDNA, 反转录30min即可, 而6kb以上的cDNA推荐反转录60min。后续用于qPCR时, 检测任何长度的基因, 通常反转录10min就足够了。**注意:** 对于GC含量较高或二级结构比较严重的模板RNA, 可以50 °C反转录60 min, 以充分利用本产品反转录酶在50 °C时仍有良好的反转录酶活性这一特点, 在较高温度进行反转录可以有效减少二级结构的干扰。
 - d. 80 °C孵育10 min以失活反转录酶(可以同时失活gDNA EZeraser)并终止反转录反应。**说明:** 对于5kb以上的长片段cDNA不推荐采用加热的方法失活反转录酶, 该方法易导致部分长片段DNA被剪切, 此时可考虑酚氯仿抽提或柱纯化方法。
 - e. 反转录产物可以直接用于后续的PCR反应等, 也可以-20 °C冻存以备以后使用。用于后续PCR反应时, 如果PCR的反应体系为20 μ l和50 μ l, 则推荐相应地使用0.8 μ l和2 μ l反转录产物。
3. 引物延伸、探针标记等其它用途请自行参考M-MLV反转录酶的相关文献资料进行。

常见问题:

1. 总RNA反转录产物电泳观察不到。
 - a. 反转录产物由于是从模板反转录而获得, 而模板的量本身比较低, 反转录的量通常还要少于模板量, 并且总RNA的反转录产物大小很不均匀, 因此通常总RNA的反转录产物直接电泳观察是观察不到的。
2. 反转录产物通过PCR扩增没有特异性条带。
 - a. PCR扩增没有获得特异性条带时建议先使用actin、GAPDH等作为内参进行PCR扩增, 看是否可以成功扩增。如果可以成功, 则说明PCR扩增体系没有问题, 此时通常是目的基因的引物设计欠佳, 当然也有可能是反转录产物质量欠佳。如果内参不能被很好地扩增, 则有可能PCR体系存在问题或反转录产物质量欠佳。
 - b. 模板RNA发生了降解。哺乳动物细胞或组织的总RNA琼脂糖电泳后应该可以看到清晰的18S和28S rRNA条带, 并且28S rRNA和18S rRNA的亮度比例应该大于等于2.0。如果比例小于2.0, 则提示总RNA发生了显著的降解, 最好能重新制备总RNA样品。避免RNA降解的主要方法是, 严格进行RNA的相关操作, 包括带洁净手套、戴一次性口罩、在洁净环境中抽提或制备RNA, 以尽量避免RNase污染。
 - c. 模板RNA的纯度偏低。在提取纯化RNA的过程中, 残留在溶液中的一些成分如苯酚、SDS、EDTA、胍盐、磷酸、焦磷酸、多胺、亚精胺等会抑制反转录酶活性。对RNA样品进行柱纯化, 或者进行沉淀、洗涤和再溶解, 通常可以有效去除残留的污染物。通常选择使用碧云天的BeyoZol或Trizol抽提获得的总RNA完全可以满足反转录反应的需要。
 - d. 反转录反应的模板量不足。在抽提获得总RNA后, 在进行一些精细的定量检测时通常会进行DNase I消化, 以充分去除可能的残留的DNA的干扰。DNase I进行热失活时, 需要加入EDTA至终浓度为2.5mM, 否则RNA在没有螯合剂的情况下, 在加热过程中容易被水解, 从而导致模板量不足。此外, 扩增特定基因时, 需要先查询该基因的组织分布特点, 利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和PCR扩增, 通常会由于模板量过少而PCR扩增失败。
 - e. 如果RNA模板富含GC或容易形成二级结构, 此时可以考虑把反转录温度提高到45-55 °C。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7153	BeyoRT™ M-MLV反转录酶	2000U
D7159	BeyoRT™ M-MLV反转录酶(RNase H-)	2000U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU

D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7166	BeyoRT™ cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	10次
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次
D7172	cDNA第二链合成试剂盒	10次
D7176S	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	10KU
D7176M	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	50KU
D7176L	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	200KU
D7178S	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	20次
D7178M	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	100次
D7178L	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	500次
D7180S	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	20次
D7180M	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	100次
D7180L	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	500次
D7182S	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	20次
D7182M	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	100次
D7182L	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	500次
D7185S	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X, with gDNA EZeraser)	20次
D7185M	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X, with gDNA EZeraser)	100次
D7185L	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X, with gDNA EZeraser)	500次
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7226	GC-rich PCR Buffer(4种套装)	共2ml
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次
D7371	dNTP Mixture(2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture(25mM each)	250µl
R0011	Beyozol(总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol(总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0102	RNase Inhibitor	2000U
ST036	DEPC	10g

Version 2020.10.12