

## BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)

产品编号	产品名称	包装
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

### 产品简介:

- 碧云天生产的 BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X), 即 BeyoRT™ III First Strand cDNA Synthesis Master Mix (5X) (with gDNA EZeraser), 是一种仅需加入 RNA 模板和水就能进行反转录的最简单、便捷、快速、稳定、高效并且能有效避免基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 干扰的 cDNA 第一链合成产品。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°C 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; -20°C 不会结冻, 取用非常便捷。
- BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser) 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°C)、高精度度、产物超长(长达 12kb)的 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶、RNase Inhibitor、Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer、Random Hexamer Primer、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反转录反应缓冲液能去除基因组 DNA 污染的 gDNA EZeraser, 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 第一链合成预混液(5X) 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 在 55°C 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 合成预混液(5X) (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°C)、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。
- BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X) (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)。

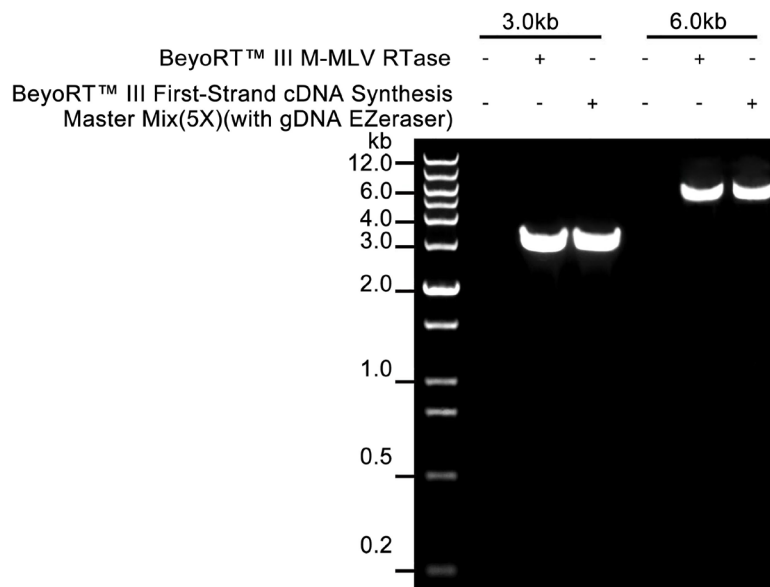


图 1. 使用碧云天的 BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)和使用 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶的常规

反转录体系的效果对比图。在 20 $\mu$ l 的反转录反应体系中，以 HEK293T 细胞中提取的 1 $\mu$ 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 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)，42 $^{\circ}$ C 反转录 60min。然后取 1 $\mu$ l 反转录产物分别进行两个目的基因(3.0kb 的 Fibrillin1 基因和 6.0kb 的 ADAR1 基因)的 PCR 扩增和电泳检测。

- 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。本产品最适反应温度为 42 $^{\circ}$ C，当温度达到 50 $^{\circ}$ C 时仍具有很高活性，对于长度较短的 cDNA 反转录，温度达到 55 $^{\circ}$ C 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。本产品反转录速度快，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**操作便捷**，作为即用型第一链合成预混液(5X)，即反转录预混液(5X)，只需加入模板RNA和水，即可快速进行反转录反应，并且BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)在-20 $^{\circ}$ C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。
- **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。
- 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
D7185S	BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)	80 $\mu$ l
D7185M	BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)	400 $\mu$ l
D7185L	BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)	2ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存。

### 注意事项：

- 由于本预混液(5X)含有适量甘油，使用时须注意与RNA样品及水充分混匀，否则可能会导致反转录不充分。
- 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. cDNA第一条链的合成(First-stand cDNA Synthesis):

##### a. 参考如下表格中设置的20 $\mu$ l反转录体系：

RNA	Total RNA	0.1ng-5 $\mu$ g
	或poly(A) RNA/mRNA	10pg-0.5 $\mu$ g
	或specific RNA	0.01pg-0.5 $\mu$ g
DEPC-treated Water	-	To 16 $\mu$ l*
<b>选择性步骤：</b> 如果模板RNA的GC含量较高(例如大于55%)或者有比较严重的二级结构，混匀后微离心以把液体沉降至管底，65 $^{\circ}$ C孵育5min，随后立即置于冰上冷却，以打开RNA中一些比较稳定的二级结构。		
BeyoRT™ III cDNA 合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)	-	4 $\mu$ l
总体积	-	20 $\mu$ l

\*To 16 $\mu$ l表示加入DEPC-treated Water至最终体积为16 $\mu$ l。

- b. 混匀反应体系(用移液器轻轻吹打数次以充分混匀或用涡旋混合器在较低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。**注：**本预混液(5X)含有适量甘油，使用时须注意与RNA样品及水充分混匀，否则可能会导致反转录不充分。
- c. 42 $^{\circ}$ C孵育10-60min。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 $^{\circ}$ C反转录60 min，以充分利用本产品反转录酶在50 $^{\circ}$ 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。如果拟在50 $^{\circ}$ C或更高温度进行反转录，推荐先在37 $^{\circ}$ C孵育2min以充分去除基因组DNA污染，然后再在50 $^{\circ}$ C或更高温度进行反转录，因为50 $^{\circ}$ C或更高温度会导致gDNA EZeraser快速失活。

- d. 80°C孵育10 min以失活反转录酶并终止反转录反应。**说明：**对于5kb以上的长片断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断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20μl和50μl，则推荐相应地使用0.8μl和2μl反转录产物。
2. 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。
  - f. BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)没有与RNA样品及水充分混匀。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7153	BeyoRT™ M-MLV反转录酶	2000U
D7159	BeyoR™ 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
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

#### 使用本产品的文献:

1. Xinxia Luo, Junyang Zhou, Zhixiao Wang, Yun He, Li Yu, Shinan Ma, Shan Wang, Xiaoli Wang, Yahong Yuan, Dongsheng Li, Taixing Cui, Yan Ding. An inhibitor role of Nrf2 in the regulation of myocardial senescence and dysfunction after myocardial infarction Life Sci. 2020 Oct 15;259:118199.;doi: 10.1016/j.lfs.2020.118199.

Version 2021.09.01