

AccelerRT® 5G Full Length cDNA Synthesis & Amplification Kit

——用于基因全长逆转录和扩增

Cat. No: PC030 (12 reactions)

PC031 (24 reactions)

PC032 (96 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文)
www.igenebio.com (中文)

AccelerRT® 5G Full Length cDNA Synthesis & Amplification Kit

- I. 产品描述
- II. 产品组分及存储
- III. 实验前准备
- IV. 实验过程
- V. 疑难解答
- VI. 使用许可与质量保证

I. 产品描述

AccelerRT® 5G Full Length mRNA Amplification Kit 能以 1 - 1000 个细胞或 10 pg -100 ng 总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)VN Primer 为逆转录引物进行 cDNA 的合成,并且利用 5G Template Switching Reverse Transcriptase 的末端转移酶活性在 cDNA 的 3'端添加一段特定的接头序列。通过该接头序列进行后续 PCR 扩增,获得全长 cDNA 扩增产物,有效避免了 cDNA 合成过程中的 3'偏好性。获得的全长 cDNA 扩增产物可以进行基因表达差异、可变剪接、融合基因等遗传调控信息分析。

本试剂盒包含优化后的细胞裂解、逆转录(RT)和 PCR 扩增等试剂,不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他的等效产品替换本试剂盒中组分,以免获得不好的结果。如需替换,请先进行验证。

产品优势

- 高灵敏度: 可以简单地从小量细胞或总 RNA 中检测到低丰度靶标;
- 高质量的 cDNA: 双端引物扩增全长 cDNA, 有效避免 5'端和 3'端偏好性;
- 节省时间: 裂解和逆转录时间短;
- 兼容性广: 预扩增兼容下游分析的 NGS 或 Real-time PCR。

II. 产品组分及存储

Cat. No: PC030 (12 reactions)

产品信息	组分	组分货号	规格	储存温度
PC030 (12 reactions)	Template Switching Oligo (TSO, 20 μM)	PC030-01	12 μl	-80℃
	10× Cell Lysis Buffer	PC030-02	12 μl	-20℃ 保存 1 年
	RNase Inhibitor (25 U/μl)	PC030-03	15 μl	
	3' Oligo(dT) Primer (10 μM)	PC030-04	12 μl	
	5× First-Strand Synthesis Buffer	PC030-05	48 μl	
	5G Reverse Transcriptase Mix	PC030-06	12 μl	
	2× PCR Amplification Mix	PC030-07	300 μl	
	PCR Forward Primer (20 μM)	PC030-08	12 μl	
	PCR Reverse Primer (20 μM)	PC030-09	12 μl	
	ddH ₂ O (RNase/DNase free)	PC030-10	500 μl	

Cat. No: PC031 (24 reactions)

产品信息	组分	组分货号	规格	储存温度
PC031 (24 reactions)	Template Switching Oligo (TSO, 20 μM)	PC031-01	24 μl	-80℃
	10× Cell Lysis Buffer	PC031-02	24 μl	-20℃ 保存 1 年
	RNase Inhibitor (25 U/μl)	PC031-03	30 μl	
	3' Oligo(dT) Primer (10 μM)	PC031-04	24 μl	
	5× First-Strand Synthesis Buffer	PC031-05	96 μl	
	5G Reverse Transcriptase Mix	PC031-06	24 μl	
	2× PCR Amplification Mix	PC031-07	600 μl	
	PCR Forward Primer (20 μM)	PC031-08	24 μl	
	PCR Reverse Primer (20 μM)	PC031-09	24 μl	
	ddH ₂ O (RNase/DNase free)	PC030-10	500 μl	

Cat. No: PC032 (96 reactions) 由 4 个 PC031 组装。

III. 实验前准备

■ 防污染要求

- 1) 试剂盒检测灵敏度高，需要避免实验交叉污染，建议 cDNA 合成与 PCR 反应的实验区域分开，并定期清洁实验区域。
- 2) 为了防止 RNA 降解，用于实验反应过程的溶液试剂、器具、枪头、离心管等尽量 DEPC 水处理，并在高压灭菌后再使用；做实验时戴上一次性手套，实验过程中避免说话。
- 3) 避免实验样品交叉污染，建议使用带滤芯的无核酸酶污染的枪头，吸取不同组分更换枪头，实验结束后用 75%乙醇擦拭移液枪和桌面。
- 4) 首次实验，避免环境污染导致结果出现假阳性，建议设计阴性对照。

■ 样本要求

1) 细胞样品

准备新鲜的哺乳动物细胞，细胞悬浮于 PBS 溶液中，细胞可直接使用本产品中的裂解液进行裂解。该产品不适用于经甲醛、丙酮等固定过的细胞。由于本试剂盒是以 Oligo dT 为引物进行反转录，因此不适用于不含 Poly A 尾的样本。

2) RNA 样品

为了获得最佳结果，请使用高质量的 Poly(A) RNA 和完整性高且纯度高的总 RNA 样本。请确保 RNA 不含污染物，如残留的蛋白质、有机溶剂和盐，这些污染物会使 RNA 降解或者降低酶的活性和敏感性。实验前可用 Agilent RNA 6000 Pico Kit 对 RNA 完整性进行评估，建议使用 RIN \geq 8 的 RNA。

■ 自备材料

- 1) 纯化试剂：Macherey-Nagel, Cat.No. 744970.50 或其他等效产品；
- 2) 建库试剂：可根据测序平台选择合适的文库构建试剂盒；
- 3) 其他材料：0.2mL PCR 管、低吸附 1.5mL EP 管、无水乙醇、iQuant™ NGS-HS dsDNA Assay Kit (Cat.No. N020-2)。
- 4) 仪器：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、移液器、磁力架、涡旋振荡仪、离心机。

IV. 实验过程

实验原理

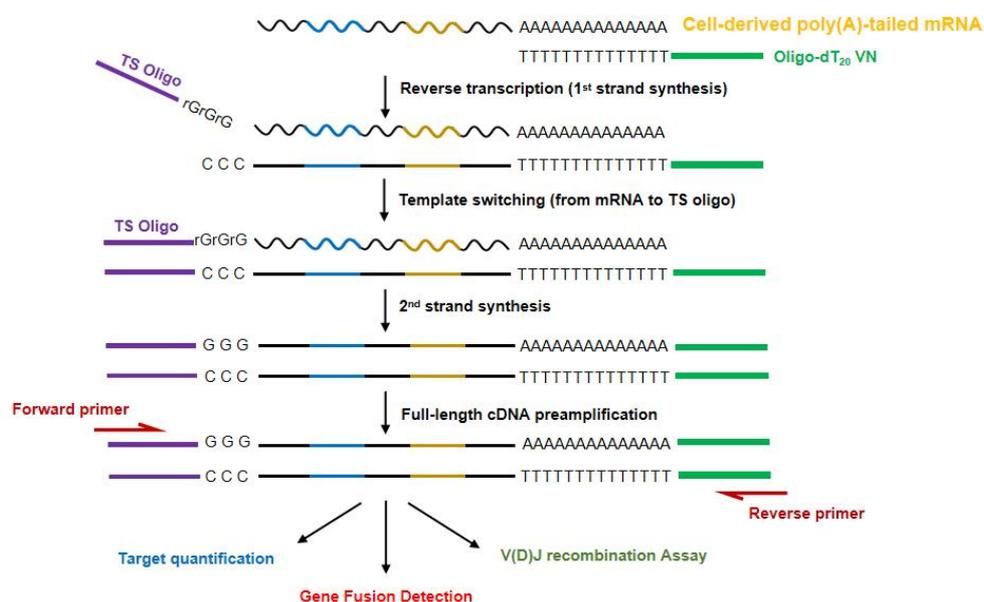


图 1. 全长 cDNA 合成原理。以哺乳动物细胞或带有 Poly(A)尾的 RNA 为模版，用 Oligo(dT) VN Primer 作为逆转录引物进行第一链 cDNA 的合成，并且利用逆转录酶的末端脱氧核苷转移酶 (TdT)活性，当逆转录酶到达 RNA 模板的 5'端时，TdT 活性在 cDNA 3'端加上几个不依赖于模版的 C 碱基。在模板转换步骤，使用 Template-switching oligo 模板转换引物合成 cDNA 的第二链，最后，用 5'端 TSO 特异性引物和 3'端通用接头引物进行 PCR 扩增以获得全长 cDNA 产物。

实验流程

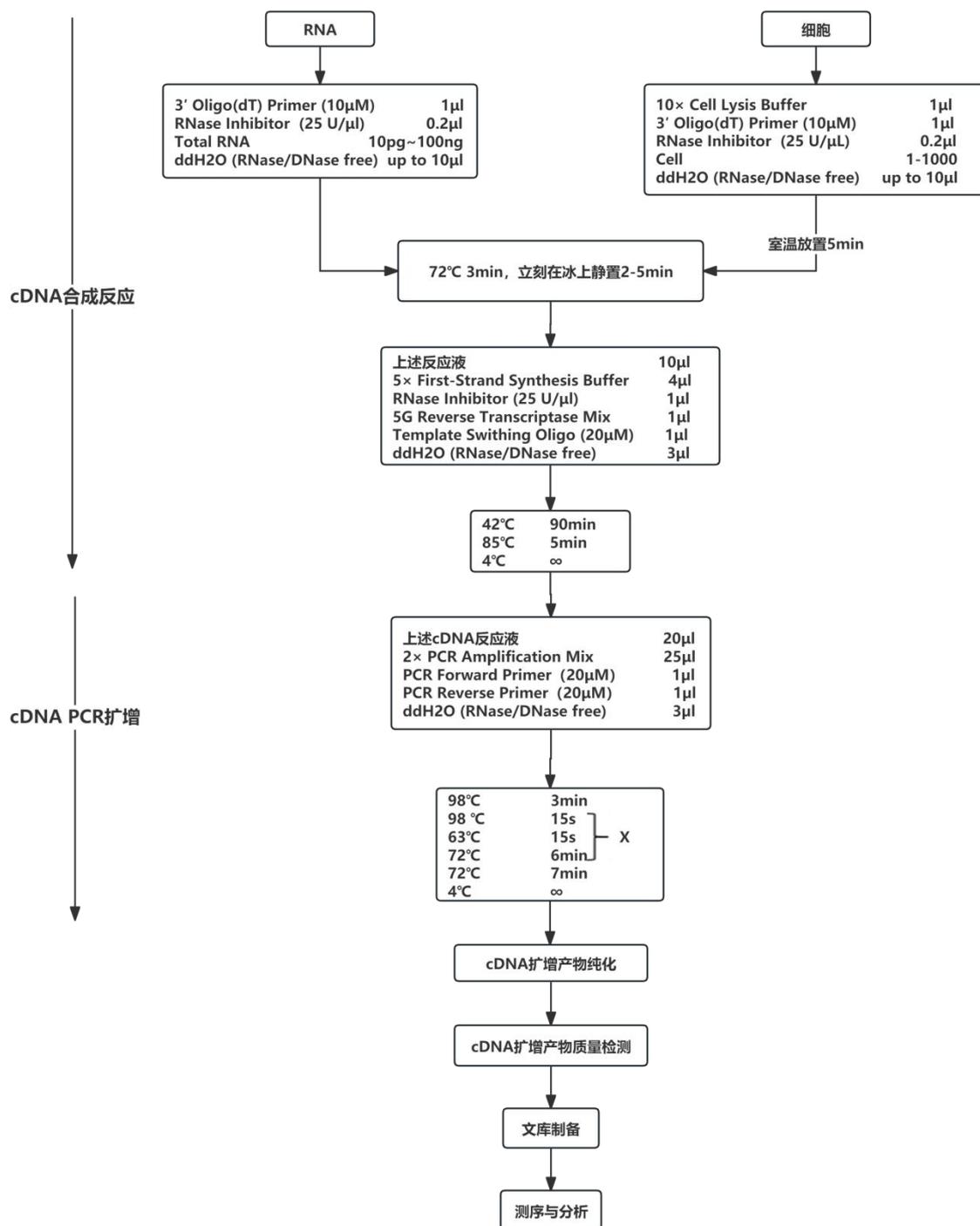


图 2. 使用 AccelerRT® 5G Full Length cDNA Synthesis & Amplification Kit 进行全长 cDNA 合成。

实验操作

1. 细胞样品裂解（或 RNA 反应）

- 1) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分，形成 **Mix1**。

组分	体积
10× Cell Lysis Buffer	1 μ L
3' Oligo(dT) Primer (10 μ M)	1 μ L
RNase Inhibitor (25 U/ μ L)	0.2 μ L
Template	10pg~100ng total RNA, 1~1,000 cells
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	add to 10 μ L

注：模板是 RNA 时，用 ddH₂O 替代 10× Cell Lysis Buffer。

- 2) 使用移液器混匀 5-10 次，然后离心，室温放置 5min（若模板是 RNA，则直接混匀后进行下一步）。
- 3) 72℃ 孵育 3min，反应完成后立刻放在冰上。

2. 逆转录试剂配置

- 1) 将反应所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心收集后置于冰上。
- 2) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分，形成 **Mix2**。

组分	体积
5× First-Strand Synthesis Buffer	4 μ L
RNase Inhibitor (25 U/ μ L)	1 μ L
5G Reverse Transcriptase Mix	1 μ L
Template Switching Oligo (20 μ M)	1 μ L
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	3 μ L
Total	10 μ L

- 3) 混匀，瞬离。

3. 逆转录反应

- 1) 将 **Mix2** 加入 **Mix1** 中，混匀离心。
- 2) 按照以下条件进行孵育。

温度	时间
42℃	90 min
85℃	5 min
4℃	∞

⊙ 暂停点：样本可在 -20℃ 保存。

4. PCR 反应

- 1) 将反应所需组分取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心收集后置于冰上。
- 2) 按照下表用量在 PCR 管中加入每个反应所需的试剂组分（所有操作在冰上进行）。

组分	体积
2× PCR Amplification Mix	25 μL
PCR Forward Primer (20 μM)	1 μL
PCR Reverse Primer (20 μM)	1 μL
cDNA	20 μL
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	Up to 50 μl

- 3) 短暂离心，确保反应液中无气泡且均置于 PCR 反应管或平板底部。
- 4) 根据下表设置 PCR 程序进行反应（以 Takara PCR 仪推荐的反应程序为例）。

温度	时间	循环数
98°C	3 min	1
98°C	15 sec	} X ^a
63°C	15 sec	
72°C	6min	
72°C	7 min	1
4°C ∞		

*a: 下表是根据 Hela cell 以及 Hela total RNA 摸索的 PCR 扩增循环数，仅供参考。不同细胞或 RNA 的表达情况不一样，因此最适的循环数需要自行做进一步摸索。扩增循环数过高会造成 PCR 扩增的偏好性，导致 DNA 文库量下降，扩增循环数过低，会导致 DNA 量不足，影响后续建库分析。

Total RNA	Cell	PCR 循环数
10pg	1	17~18
100pg	10	14~15
1ng	100	11~12
10ng	1000	8~9
100ng	—	7~8

⊙暂停点：样本可在-20°C保存。

5. cDNA 扩增产物纯化

以 DNA 纯化试剂盒 NucleoMag kit for clean up and size selection of NGS library prep reactions (Macherey-Nagel, Cat.No. 744970.50)为例，步骤如下：

实验前准备:

首次使用, 可根据实验情况将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中, 保存在 4°C; 每次实验前, 可根据实验量, 配制新鲜的 80%乙醇, 每个样品需要 400 µl。

操作步骤:

- 1) 将磁珠充分涡旋混匀后置于室温平衡 30 min, 放置结束后再次涡旋混匀;
- 2) 添加 50 µl 的已平衡的磁珠至上述 50 µl PCR 扩增产物中(按照磁珠:样品的比例为 1:1), 涡旋充分混匀, 短暂离心;
- 3) 将磁珠 / DNA 混合物在室温下孵育 10 分钟, 让 DNA 与磁珠结合;
- 4) 将样品放在磁力架上至少 5 分钟, 直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去除上清液, 注意不要打散磁珠;
- 5) 保持 PCR 管始终处在磁力架上, 加入 200 µl 新鲜配制的 80%乙醇 (注意加入乙醇时不要影响干扰磁珠), 室温孵育 30 sec, 小心移除上清;
- 6) 重复步骤 5) 一次;
- 7) 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 开盖干燥磁珠 5 ~ 10 min 至无乙醇残留;
- 8) 磁珠晾干后, 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 17~50 µl Nuclease free water 覆盖磁珠, 使用移液器吹打混匀磁珠, 室温孵育 2 min;
- 9) 将 PCR 管短暂离心, 置于磁力架上, 分离磁珠和液体直到溶液澄清 (约 5 min);
- 10) 小心吸取上清转移到新的低吸附 EP 管中 (勿吸到磁珠), -20°C 保存。(为避免 DNA 降解, 建议尽快进行文库构建)

◎ 暂停点: 样本可在 -20°C 保存。

6. cDNA 扩增产物质量检测

- 1) 取 2 µl 纯化后的 DNA 扩增产物, 使用 Qubit 4 Fluorometer 和 iQuant™ NGS-HS dsDNA Assay Kit (Genecopoeia, Cat. N020-2) 检测 PCR 产物浓度。具体操作请参照上述产品的说明书。
- 2) 根据模板加入量的不同, 预期实验反应会产生 2 ~ 20 ng 的扩增产物。

7. 文库制备

文库制备可根据测序平台选择合适的文库构建试剂盒。

V. 疑难解答

qPCR

问题	造成原因	建议
扩增产物量低	使用的 RNA 质量不好	使用 3'端含有完整 poly(A)序列的高质量 RNA
	扩增循环次数不够	RNA 和生物样品中的 RNA 数量存在很大的差异, 建议进行实验筛选评估 RNA 的使用量, 并相对应调整扩增循环次数
检测不到低表达量的靶标	DNA 样品浓度太低	通过纯化来富集 cDNA 样品, 然后样品不稀释直接进行 qPCR 检测
掺入 RNA 显示没有扩增曲线	掺入的 RNA 不是 poly(A) RNA	使用高质量的 poly(A) RNA
基线荧光信号高	PCR 预扩增引物浓度高	纯化 cDNA 样品, qPCR 检测前稀释样品
非均匀扩增	使用的 RNA 质量不好, RNA 5'端降解导致 3'端扩增的偏好性	使用 3'端含有完整 poly(A)序列的高质量 RNA
	使用 RNA 浓度太高	建议减少 Total RNA 使用量, 用量低于 10ng
	扩增循环数太高	扩增循环数次数不建议超过说明书推荐

NGS

问题	造成原因	建议
测序结果显示引物二聚体浓度高	样品没进行纯化或纯化流程不正确	通过毛细管电泳测量引物浓度
纯化、扩增的产物引物二聚体含量高	样品没进行纯化或纯化流程不正确	将样品加入无核酸酶污染水至 50 µl 后重新再纯化一次
扩增产物量低	使用的 RNA 质量不好	使用 3'端含有完整 poly (A)序列的高质量 RNA
	扩增循环次数不够	RNA 和生物样品中的 RNA 数量存在很大的差异, 建议进行实验筛选评估 RNA 的使用量, 并相对应调整扩增循环次数
毛细管数据出现额外峰 (>300bp)	掺入质控品 (如 ERCC)浓度太高	减少掺入质控品浓度, 优化实验来确定每个样品的合适用量
	rRNA 扩增产物量高	减少 RT 反应时间
毛细管数据出现额外峰 (<300bp)	样品纯化流程不正确	将样品加入无核酸酶污染水至 50 µl 后重新再纯化一次

VI. 有限使用许可和保证

有限保证

GeneCopoeia 保证该产品 (AccelerRT® 5G Full Length cDNA Synthesis & Amplification Kit) 符合产品手册上的说明。如果证明该产品与产品说明信息不符, 购买方须将该产品在 5 个工作日内返回给 GeneCopoeia, 而 GeneCopoeia 将免费替换该产品。如果不能提供替换产品, GeneCopoeia 将退款或 credit 给购买方。此保证仅限于产品的原始购买者, 且不得延伸至原始购买者以外的使用者。GeneCopoeia 的责任仅限于替换, 退款或 credit (指选择不退款, 剩余款项用于后续购买产品的支付) 该产品, 且退款或 credit 只限于实际的购买价格但不包括寄送费用。GeneCopoeia 不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损失所产生的后果负责。GeneCopoeia 提供此唯一保证。GeneCopoeia 对于产品的适销性以及任何特定使用用途不再提供任何其他保证。

有限使用许可

购买方需同意接受以下有限使用许可条款。GeneCopoeia 的产品仅限于购买方内部研究使用, 不可以任何方式转让给第三方; 不可用于包括人类或诊断及治疗在内的其他用途。未经 GeneCopoeia 的书面批准, 不得对此产品进行更改、重新包装、转售或用于制作商业化产品。此产品须按 NIH 指南用于 DNA 重组和基因研究。对此产品任何使用都构成对以上条款的承诺和接受。

GeneCopoeia 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果您对我们的产品有任何问题和担忧, 请与我们联系: 020-28069233。

PC030-082224

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。



地址: 广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器F区F801
客服电话: 020-28069233

E-mail: support@igenebio.com

邮编: 510663
网址: www.igenebio.com