

天
净
沙
系
列

CAT#:131083-20
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

天净沙 Ribo-SPIA cDNA 扩增试剂盒

Ribo-SPIA RNA Amplification Kit

使用手册 V1.0

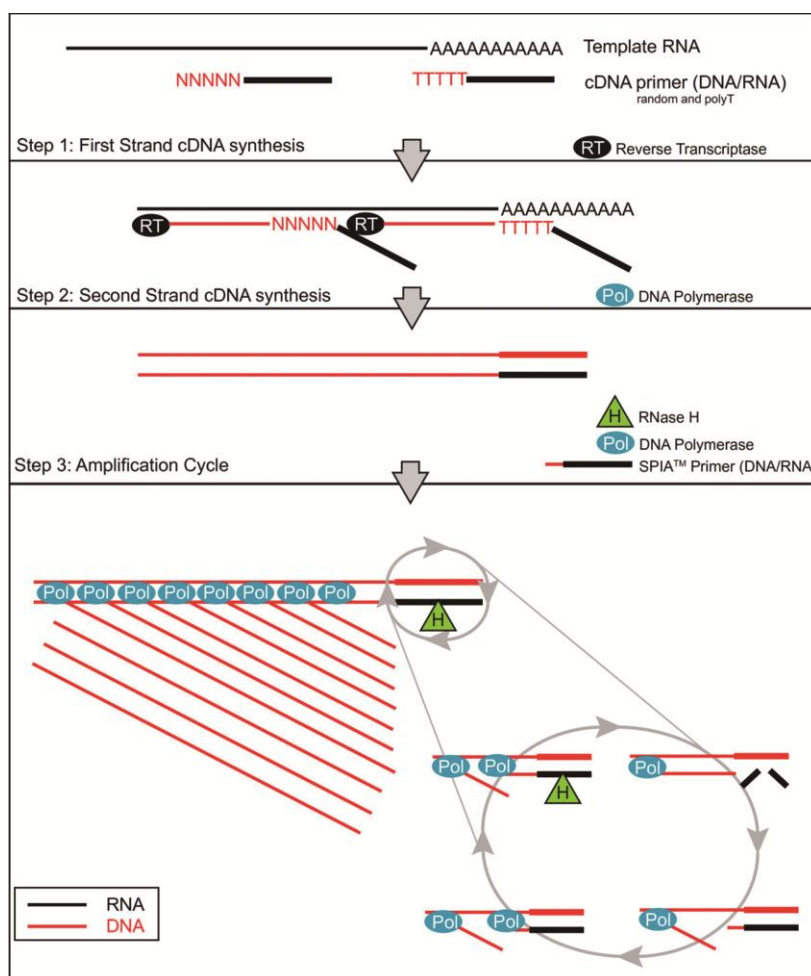
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

血液样品和各种临床样品（包括组织检查、FFPE 切片或少量细胞样品）都是基因表达分析和诊断的常见材料，但这些样品通常数量有限，质量不高，并且还没法进行第二次取样。所以得到足够 RNA 量供后续试验是一个非常棘手的瓶颈。为解决这一问题，本公司根据 Ribo-SPIA 技术，开发了本产品。Ribo-SPIA 技术的核心是利用 DNA/RNA 嵌合引物，以带 polyA 尾巴的 mRNA 为模板进行逆转录并得到双链 cDNA、RNase H 不间断地在 cDNA 第 1 链中的 RNA 部分产生裂口，DNA 聚合酶以此裂口为基础进行链取代聚合反应，产生 cDNA 单链。此技术原理图如下：



本产品具有下列特点：

1. 高效,能线性扩增 1000-10000 倍,能用 5-100 ng 总 RNA 模板扩增得到 5 ug 左右的单链 cDNA (扩增的 cDNA 主要来源于总 RNA 中的 mRNA)。
2. 步骤简单方便,扩增在恒温进行,只需要 4 个小时,不需要特殊仪器设备。
3. 保真性好,保持 RNA 样品中各分子的相对丰度。
4. 尤其适用于 RNA 产量和质量都不高的样品。
5. 扩增得到的单链 cDNA 能直接用于各种后续试验,包括 qPCR、芯片分析、杂交反应等。
6. 本产品足够做 10 次双链 cDNA 的合成,20 次 SPIA 扩增。

规格及成分	成 份	编 号	20 次塑料袋包装													
	cDNA 一链合成缓冲液	130308A	40 uL													
	MMLV 逆转录酶	60905	10 uL													
	cDNA 二链合成缓冲液，5×	130308B	160 uL													
	cDNA 二链合成酶混合液 20×	130308C	40 uL													
	SPIA RT 引物	Yw1193	40 uL													
	SPIA 反应液，5×	131083A	320 uL													
	SPIA 扩增引物	Yw1192	320 uL													
	SPIA 酶混合液	131083D	120 uL													
	超纯水	100935	1 mL													
	使用手册	1 份														
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期为 1 年。															
使用方法	一：样品 RNA 的制备															
	本产品不含 RNA 相关试剂,用于 Ribo-SPIA 扩增的每个批次的 RNA 样品最好先做一个预实验。总 RNA 样品的浓度必须在 1-20ng/uL，一次 RIBO-SPIA 所需总 RNA 的量为 1ug。也可以使用 mRNA，一次 Ribo-SPIA 所需总 mRNA 的量为 5-100 ng。过低则需要浓缩，过高则需要用无 RNase 的水稀释。RNA 必须经过 DNase 处理，不能含 DNA 污染。微量提取时不能使用核酸类的助沉剂。注意：本产品只能扩增含带 polyA 尾巴的 RNA，不能扩增 DNA 和不含 polyA 尾巴的 RNA。															
使用方法	二：一管式双链 cDNA 的合成															
	1. 在 0.5mL PCR 管中，按下表配制双链 cDNA 合成反应。注意：最好每次实验设置一个阴性对照组，在此对照中用超纯水替代自备的 mRNA 或总 RNA: <table><tr><td>成分</td><td>用量</td></tr><tr><td>自备 mRNA 或总 RNA</td><td>4 uL mRNA (5-100ng) 或 4 uL 总 RNA (1ug)</td></tr><tr><td>SPIA RT 引物 20uM</td><td>1 uL</td></tr><tr><td colspan="2">65℃ 5 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心后放 4℃</td></tr><tr><td>cDNA 一链合成缓冲液</td><td>4 uL</td></tr><tr><td>MMLV 逆转录酶</td><td>1 uL</td></tr><tr><td colspan="2">轻柔吹打混匀后得到 10uL 的反应体系。42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA。结束后 70℃保温 15 分使酶变性，最后 4℃放</td></tr></table>			成分	用量	自备 mRNA 或总 RNA	4 uL mRNA (5-100ng) 或 4 uL 总 RNA (1ug)	SPIA RT 引物 20uM	1 uL	65℃ 5 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心后放 4℃		cDNA 一链合成缓冲液	4 uL	MMLV 逆转录酶	1 uL	轻柔吹打混匀后得到 10uL 的反应体系。42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA。结束后 70℃保温 15 分使酶变性，最后 4℃放
成分	用量															
自备 mRNA 或总 RNA	4 uL mRNA (5-100ng) 或 4 uL 总 RNA (1ug)															
SPIA RT 引物 20uM	1 uL															
65℃ 5 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心后放 4℃																
cDNA 一链合成缓冲液	4 uL															
MMLV 逆转录酶	1 uL															
轻柔吹打混匀后得到 10uL 的反应体系。42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA。结束后 70℃保温 15 分使酶变性，最后 4℃放																

	置，然后加入下列成分，得到 80uL 反应体系。																	
	超纯水	50 uL																
	cDNA 二链合成缓冲液	16 uL																
	cDNA 二链合成酶混合液	4 uL																
	轻柔吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时合成 cDNA 第二链，然后 75℃ 15 分灭活酶，最后 4℃放置待用																	
	三：SPIA 扩增																	
	2. 在 0.5mL PCR 管中，按下表配制 20uL 的 SPIA 反应体系。注意：最好设置两个阴性对照组，在此两个对照中分别用超纯水替代 SPIA 引物和 cDNA 双链反应液。																	
	<table><tr><th>成分</th><th>用量</th></tr><tr><td>cDNA 双链反应产物</td><td>40 uL(来于上步)</td></tr><tr><td>SPIA 扩增引物 10uM</td><td>16 uL</td></tr><tr><td>SPIA 反应液，5×</td><td>16 uL</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>42 uL</td></tr><tr><td colspan="2">94℃20 秒后 50℃放置复性待用</td></tr><tr><td>SPIA 酶混合液</td><td>6 uL</td></tr><tr><td colspan="2">轻柔吹打混匀后得到 120 uL 反应体系，50℃扩增 60 分钟，最后 4℃放置</td></tr></table>		成分	用量	cDNA 双链反应产物	40 uL(来于上步)	SPIA 扩增引物 10uM	16 uL	SPIA 反应液，5×	16 uL	超纯水	42 uL	94℃20 秒后 50℃放置复性待用		SPIA 酶混合液	6 uL	轻柔吹打混匀后得到 120 uL 反应体系，50℃扩增 60 分钟，最后 4℃放置	
	成分	用量																
	cDNA 双链反应产物	40 uL(来于上步)																
SPIA 扩增引物 10uM	16 uL																	
SPIA 反应液，5×	16 uL																	
超纯水	42 uL																	
94℃20 秒后 50℃放置复性待用																		
SPIA 酶混合液	6 uL																	
轻柔吹打混匀后得到 120 uL 反应体系，50℃扩增 60 分钟，最后 4℃放置																		
四：SPIA 扩增产物的检测																		
3. 取 5uL SPIA 扩增产物进行 PAGE 电泳检测。标准的反应结果是产生长度在 200-2000bp 之间的产物。																		

	4. 如果产物将用于 PCR 定量，则可以不经纯化直接使用，如果需要用于芯片杂交和浓度测定,则需要按常规的方法纯化 cDNA 以便去除残留的 dNTP 和引物。	
	5. OD 检测纯度和浓度。在 OD260 的波长下测样品你给的光吸收。由于扩增产物是单链 DNA，故 1OD260=33ug/mL。	
	6. 所得 DNA 可以放-20℃长期放置。	
	关联产品	一管式双链 cDNA 合成试剂盒（CAT#: 131083）