

第一链 cDNA 合成试剂盒

First-Strand cDNA Synthesis Kit

(反转录试剂盒)



一、试剂盒组成：

Material Provided	ZK402 (50 次)
2X First-Strand Buffer	500 μ l
RT-mix	50 μ l
Random primer (0.1 μ g/ μ l)	50 μ l
Oligo(dT) ₁₈ primer (0.1 μ g/ μ l)	50 μ l
DEPC-treated Water	1ml
Protocol	1 份

注意：所有试剂必须在-20℃保存。

二、简介：

本试剂盒提供的试剂能从微量的 poly(A)+ mRNA 或总 RNA 中高效率的合成出 cDNA 第一链。MMLV Reverse Transcriptase 是已知反转录酶中 RNA 反转录活性最强的一种。它能非常有效地以 RNA 为模板，在 Oligo(dT) primer, Random Primers 或其它特定的引物与 RNA 退火后，从引物的 3'-末端合成与 RNA 互补的 DNA (cDNA 第一链)。第一链 cDNA 可以用于后续的荧光定量 PCR(与荧光定量 PCR 核心试剂盒配合使用)、RT-PCR、cDNA 库构建等实验。

三、准备工作：

- 1) 用 0.1%DEPC 水过夜室温或 37C 处理 1.5 ml Eppendorf 管和取液用 10 μ l, 200 μ l 和 1 ml Tip, 高温蒸气灭菌, 80℃烘干备用。
- 2) 制备 RNA 模板。总 RNA 和 mRNA 均可以作为 First-Strand cDNA 合成的模板材料。本试剂盒每次反应需要 500ng-2 μ g 左右 总 RNA 或者 25-50ng 左右的 mRNA。RNA 溶于 DEPC-H₂O, 体积小于 8 μ l。

四、First-Strand cDNA 合成：

注意：戴手套进行以下操作，严防 RNase 污染。

1. 在 1.5ml Eppendorf 管中加入 500ng-2 μ g 总 RNA, 或 25-50ng poly(A)+ mRNA。加入 DEPC-H₂O 使总体积为 8 μ l。
2. 加入 1 μ l Random primers, 或 1 μ l Oligo(dT)₁₈ primer, 或者 1 μ l 的特异性下游引物 (25pmol/ μ l)。小心混匀。
3. 65℃保温 5 分钟。
4. 室温放置 10 分钟。室温高速离心 5 秒钟, 将所有溶液收集到管底。
5. 按次序分别加入下列试剂:
2X First-Strand Buffer 10 μ l

RT-mix	1ul
Total:	20ul

6. 小心混匀, 如果是用Random primers, 建议 25°C 10 分钟, 40°C 50 分钟; 如果是用 Oligo(dT)₁₈ primer, 建议 42°C 50 分钟; 如果是用特异性的下游引物, 建议 48°C 50 分钟。
7. 然后 90°C 处理 5 分钟。冰上冷却, 室温高速离心 5 秒钟, 将所有溶液收集到管底。
8. 反转录好的cDNA可以用于PCR扩增、荧光定量PCR检测或cDNA的 2nd链的合成。

五、注意:

- 引物如何选用取决RNA模板的类型。Oligo(dT)₁₈引物用于RNA 3'-末端有poly(A)⁺结构的cDNA合成, 合成效率高, 特异性好。Random primer则适用各种RNA, 合成效率高, 通用性好, 但特异性较差, 对RNA模板的质量要求较高, 通常要求RNA模板无DNA污染。如果合成的cDNA仅仅用于扩增特定的基因, 合成cDNA第一链的引物也可以是用户特定的引物, 序列与RNA互补。
- 制备的cDNA可以不纯化直接用作PCR模板, 用量为 1-5μl。如使用过量, 1st strand cDNA合成反应体系中的盐和Random primers将会抑制Taq DNA聚合酶的活性。
- 如果有必要cDNA 1st strand纯化, 可按下列方式纯化: cDNA合成反应结束后(步骤 6), 在反应体系中加入RNase A, 37°C 保温 10 分钟, 用柱子回收cDNA。
- 如果后续操作对 cDNA 的用量不是很多, 可以相应减少用, 整个体系可以缩小到 10ul, 各试剂的用量相应减半。
- **Only for Research!**



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn

