

cDNA 第一链合成试剂盒说明书

产品组成

cDNA 第一链合成试剂盒 Cat. No.	5 次制备 7306005	25 次制备 7306025	100 次制备 7306100
5×gDNA Buffer	15 μl	60 μl	220 μl
RNase-free Water	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml×2
5×RT Buffer	25 μl	110 μl	420 μl
RT Enzyme Mix	15 μl	60 μl	220 μl
RT Primer Mix	25 μl	110 μl	420 μl

产品储存与有效期

- 20℃保存，有效期为两年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本试剂盒是一种高效、快速并可以去除基因组 DNA 污染的反转录系统，操作步骤简单，可在半小时内完成 cDNA 第一链的合成，非常适合荧光定量 PCR 及普通 RT-PCR 实验。本试剂盒含有高效去除基因组 DNA 的 dsDNase (dsDNase 能够特异性的消化双链 DNA)，通过 42℃，3 min 即可去除 gDNA，有效避免了总 RNA 中基因组 DNA 的干扰，且不会消化引物、探针、RNA 以及后续合成的 cDNA，提高了实验的灵敏度。本试剂盒所含的高效反转录酶 RT Enzyme，42℃，15 min 即可完成 cDNA 第一链的合成。本试剂盒还具有与 RNA 模板高亲合性的特点，能通读 GC 含量高，二级结构复杂的 RNA 模板。

用户需自备的试剂与物品

1. 水浴锅或普通 PCR 仪
2. 冰浴
3. RNase-free 的 PCR 管
4. 移液器及 RNase-free 吸头
5. 一次性手套、口罩及防护用品和纸巾
6. 台式小量离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子)

注意事项

1. 以下操作步骤请在冰浴上进行，以避免 RNA 降解。
2. 对于二级结构非常复杂的 RNA 模板，推荐将模板 RNA 在 65℃ 孵育 5 分钟后迅速转移到冰浴中，再进行 cDNA 的合成。
3. RT Primer Mix 中含有 Oligo-dT 和随机引物，如果用户需要单独使用 Oligo-dT 或者基因特异性引物，请按 Oligo-dT Primer 50 pmol/20 μl 或者反向基因特异性引物 5 pmol/20 μl 的比例加入引物，并将加入引物的体积用 RNase-free Water 调整为 4 μl 后替换 RT Primer Mix。

操作步骤：

以下操作步骤适用于模板量为 50 ng-2 μ g 的总 RNA，如果总 RNA 量大于 2 μ g，请按比例扩大反应体系。

1. 将模板 RNA 在冰上解冻；5 \times gDNA Buffer、RNase-free Water、5 \times RT Buffer、RT Primer Mix 在室温（15-25 $^{\circ}$ C）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
2. 按照表 1 的基因组 DNA 去除体系配制混合液，彻底混匀，简短离心，并置于 42 $^{\circ}$ C 孵育 3 min。然后置于冰上放置。

* RNA 的完整性对逆转录非常重要，若 RNA 模板被降解，将导致 cDNA 产物减少，或者不能扩增长片段的基因。

表 1: gDNA 去除反应体系

5 \times gDNA Buffer	2 μ l
Total RNA	n μ l (50 ng-2 μ g)
RNase-free Water	(8-n) μ l

3. 按照表 2 的逆转录反应体系配制混合液。

* 如果一次性要合成多管不同的 cDNA，可预先按倍数将逆转录反应体系中的各个组分加入到一个 PCR 管中并混匀，然后再按 10 μ l/管的量分装到 gDNA 去除反应体系中，以减少实验误差。

表 2: 逆转录反应体系

5 \times RT Buffer	4 μ l
RT Enzyme Mix	2 μ l
RT Primer Mix	4 μ l

4. 将逆转录反应体系中的混合液，加到 gDNA 去除反应体系的混合液中，充分混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
5. 42 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。
6. 95 $^{\circ}$ C 孵育 3 min 之后放于冰上，得到的 cDNA 可用于后续实验，或 -20 $^{\circ}$ C 低温保存。

* 步骤 5、6 可在 PCR 仪上完成。

* 若后续实验为实时荧光定量 PCR，cDNA 的加样量不应超过 PCR 体系终体积的 1/10，例如 50 μ l 的 PCR 反应体系，cDNA 的加样量应不超过 5 μ l。

* 如果 cDNA 用作荧光定量 PCR 时，未呈现标准的“S”形曲线，可能是 cDNA 的浓度过高而影响背景荧光的采集，建议将得到的 cDNA 稀释 2-5 倍后再进行荧光定量 PCR 实验。