

All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA Purge)

产品组成

All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA Purge)	50 次制备	100 次制备
Cat. No.	7316050	7316100
5×All-in-one RT Buffer	210 μ l	420 μ l
Enzyme Mix	60 μ l	115 μ l
No RT Control Enzyme Mix	10 μ l	20 μ l
RNase-free Water	1.5 ml	1.5 ml×2

产品储存与有效期

- 20°C 保存，有效期为 1 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

All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA Purge) 是 cDNA 第一链合成试剂盒的升级版，可在同一管中进行基因组 DNA 去除和 RNA 反转录两个反应，操作简便，可有效降低复杂加样过程中造成的样品污染和 RNA 降解的风险。另外，本试剂盒还提供了 No RT Control Enzyme Mix，用于配置无反转录酶的对照组，判断 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

本试剂盒采用了 dsDNase 高效去除基因组 DNA，区别于常规的 DNase I，dsDNase 能够特异性的消化双链 DNA (dsDNA、DNA 与 RNA 的杂合链)，不会消化引物、RNA 以及后续合成的 cDNA，提高了实验的灵敏度，并且 dsDNase 具有热敏感性，可在高温条件下快速不可逆地失活，不会影响后续实验。本试剂盒所含的高效反转录酶，可耐受 55°C 的反应温度，适合具有复杂二级结构的 RNA 模板的反转录。合成的第一链 cDNA 能直接用于普通 PCR 或荧光定量 PCR (包括染料法和探针法)。

用户需自备的试剂与物品

- 普通 PCR 仪
- 冰浴
- RNase-free 的离心管和 PCR 管
- 移液器及 RNase-free 吸头
- 一次性手套、口罩及防护用品和纸巾
- 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

- 反应液配制请在冰浴上进行，以避免 RNA 降解。
- RNA 的完整性对反转录非常重要，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，因此尽量使用高质量的 RNA 模板。
- 对于二级结构非常复杂的 RNA 模板，推荐将模板 RNA 在 65°C 孵育 5 分钟后迅速转移到冰浴中，再进行 cDNA 的合成。

操作步骤：

1. 将模板 RNA 在冰上解冻；将 5×All-in-one RT Buffer、RNase-free Water 在室温(15-25°C)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液颠倒混合混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
2. 按下表配制反应混合液

5×All-in-one RT Buffer	4 μ l
Enzyme Mix	1 μ l
Total RNA	n μ l (1 ng-2 μ g)
RNase-free Water	至 20 μ l

用移液器轻轻吹打或轻弹管壁直至充分混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

* 如果要一次性合成多管不同的 cDNA，可预先按倍数将反应体系中的各个组分加入到一个离心管中并混匀，然后再按(20-n) μ l/管的量分装到 PCR 管中，再加入 RNA，以简化操作、减少实验误差（由于移液器的误差，通常混好的 x 个样本的反应液只够分装 x-1 个 PCR 管，建议计算样本数时增加一管）。

3. 按下表配制 No RT Control 反应混合液（可选）

No RT Control 是指不加反转录酶的阴性对照反应，用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

5×All-in-one RT Buffer	4 μ l
No RT Control Enzyme Mix	1 μ l
Total RNA	n μ l (1 ng-2 μ g)
RNase-free Water	至 20 μ l

用移液器轻轻吹打或轻弹管壁直至充分混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

4. 反应程序

温度	时间
37°C	5 min
50°C	15 min
95°C	3 min

5. 得到的 cDNA 可立即用于后续实验，或于 -20°C 保存。

* 若后续实验为荧光定量 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 的加样量不应超过 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。