

天
净
沙
系
列

CAT#:60906-50
低温运输,-20℃保存

TIANDZ

cDNA 第一链合成试剂盒

1st-Strand cDNA Synthesis Kit

使用手册 V1.2

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

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒提供合成 cDNA 第一链所需要的全部试剂。其原理是用突变的莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶 (M-MuLV RT) 高效合成 mRNA 的全长 cDNA 拷贝。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 使用突变的反转录酶，内源 RNase H 活性低。 2. 最长可合成 13 Kb 的 cDNA。 3. 可以使用 oligo-dT、随机引物和 RNA 专一性引物三种引物（前两种本试剂盒提供）。 4. 总 RNA、poly(A)+RNA 或特殊 RNA 均可作为模板。 5. 可用于 cDNA 文库构建、RT-PCR、探针标记等。 																							
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="555 667 1422 1115"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十块盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MMLV (含 RI)</td> <td>60906A</td> <td>100 uL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>RT Buffer (含 dNTP)</td> <td>60906B</td> <td>250 uL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>Oligo (dT)₁₈ 引物(0.5 ug/uL)</td> <td>100814</td> <td>50 uL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td>随机引物(0.2 ug/uL)</td> <td>100409</td> <td>50 uL (本色盖)</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>80403</td> <td>1 mL (亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>60906sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	十块盒包装	MMLV (含 RI)	60906A	100 uL (红盖)	RT Buffer (含 dNTP)	60906B	250 uL (白盖)	Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 ug/uL)	100814	50 uL (绿盖)	随机引物(0.2 ug/uL)	100409	50 uL (本色盖)	RNase-free 水	80403	1 mL (亮黄盖)	使用手册	60906sc	1 份
成份	编号	十块盒包装																						
MMLV (含 RI)	60906A	100 uL (红盖)																						
RT Buffer (含 dNTP)	60906B	250 uL (白盖)																						
Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 ug/uL)	100814	50 uL (绿盖)																						
随机引物(0.2 ug/uL)	100409	50 uL (本色盖)																						
RNase-free 水	80403	1 mL (亮黄盖)																						
使用手册	60906sc	1 份																						
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																							
<p>使用方法</p>	<p>一：合成 PCR 用的 1st-strand cDNA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 按下表配制 RT 反应体系： <table border="1" data-bbox="555 1323 1230 1641"> <tbody> <tr> <td>RNA 模板</td> <td></td> </tr> <tr> <td>总 RNA</td> <td>100-500 ng</td> </tr> <tr> <td>或 poly(A) mRNA</td> <td>10-500 ng</td> </tr> <tr> <td>或专一的 RNA</td> <td>0.01 pg-500 ng</td> </tr> <tr> <td colspan="2">注意：RNA 样品不能含有基因组 DNA 污染。</td> </tr> </tbody> </table> <p>引物</p> <table border="1" data-bbox="555 1704 1230 2085"> <tbody> <tr> <td>Oligo (dT)₁₈(0.5 ug/uL)</td> <td>1 uL</td> </tr> <tr> <td>或随机引物(0.2 ug/uL)</td> <td>1 uL</td> </tr> <tr> <td>或 RNA 模板专一性引物</td> <td>15-20 pmol</td> </tr> <tr> <td colspan="2">注意：随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>补水到 13 uL</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> 2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。 			RNA 模板		总 RNA	100-500 ng	或 poly(A) mRNA	10-500 ng	或专一的 RNA	0.01 pg-500 ng	注意：RNA 样品不能含有基因组 DNA 污染。		Oligo (dT) ₁₈ (0.5 ug/uL)	1 uL	或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL	或 RNA 模板专一性引物	15-20 pmol	注意：随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。		RNase-free 水	补水到 13 uL	
RNA 模板																								
总 RNA	100-500 ng																							
或 poly(A) mRNA	10-500 ng																							
或专一的 RNA	0.01 pg-500 ng																							
注意：RNA 样品不能含有基因组 DNA 污染。																								
Oligo (dT) ₁₈ (0.5 ug/uL)	1 uL																							
或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL																							
或 RNA 模板专一性引物	15-20 pmol																							
注意：随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。																								
RNase-free 水	补水到 13 uL																							

3. 再加入 5 uL RT Buffer (含 dNTP)。
4. 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板, 可以改成 45℃保温 5 分钟。如果使用随机引物, 则改成 25℃ 5 分钟。
5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶 (含 RI), 反应终体积为 20 uL。
6. 42℃保温 60 分钟 (但如果使用随机引物, 需要先 25℃保温 10 分钟, 然后再转移到 42℃保温 60 分钟)。此步为 RT 反应。
7. 70℃保温 10 分钟以终止反应, 然后放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用, 不需要纯化。

二: 合成建文库用的 1st-strand cDNA

1. 按下表配制 RT 反应体系:

RNA 模板	
poly(A) mRNA	1 ug
或专一的 RNA	0.5-1 ug
注意: RNA 样品不能含有基因组 DNA 污染。	
引物	
Oligo (dT) ₁₈ (0.5 ug/uL)	1 uL
或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL
或 RNA 模板专一性引物	100 pmol
注意: 随机引物于 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。	
RNase-free 水	补水到 13 uL

2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。
3. 再加入 5 uL RT Buffer (含 dNTP)。
4. 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板, 可以改成 45℃保温 5 分钟。如果使用随机引物, 则改成 25℃ 5 分钟)。
5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶 (含 RI), 反应终体积为 20uL。
6. 42℃保温 60 分钟 (但如果使用随机引物, 需要先 25℃保温 10 分钟, 然后再转移到 42℃保温 60 分钟)。此步为 RT 反应。
7. 70℃保温 10 分钟以终止反应, 放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以用于第二链 cDNA 的合成或放置在-20℃长期保存。

三: 用对照模板合成 cDNA(需要用同位素, 需要对照的客户需要单独跟天泽基因联系)

1. 按下表配制 RT 反应体系:

对照 RNA 模板(0.5 ug/uL)	2 uL
引物	
Oligo (dT) ₁₈ (0.5 ug/uL)	1 uL
或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL
或对照专用引物	2 uL
RNase-free 水	补水到 13 uL

2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。
3. 再加入 5 uL RT Buffer (含标记 dNTP, 本试剂不提供)。
4. 37℃保温 5 分钟。如果使用随机引物, 则保温温度只能是 25℃。
5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶 (含 RI), 反应终体积为 20uL。
6. 42℃保温 60 分钟 (但如果使用随机引物, 需要先 25℃保温 10 分钟, 然后再转移到 42℃保温 60 分钟)。
7. 加 1uL 0.5M EDTA, 放置在冰上待用。
8. 电泳检测。合成的 cDNA 的量一般有加入 RNA 总量的 50%以上, 电泳一般能出现 1.1Kb 的片段 (如果使用随机引物, 将出现多个小片段)。

关联产品

两管式 RT-PCR 试剂盒 (CAT#: 80206)