

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

产品及特点	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。 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。																							
规格及成分		成 份	编号	十块盒包装																				
		MMLV（含 RI）	60906A	100 uL																				
		RT Buffer（含 dNTP）	60906B	250 uL																				
		Oligo (dT)18 引物(0.5 ug/uL)	100814	50 uL																				
		随机引物(0.2 ug/uL)	100409	50 uL																				
		RNase-free 水	80403	1 mL																				
		使用手册		1 份																				
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																							
使用方法	一：合成 PCR 用的 1st-strand cDNA 1. 按下表配制 RT 反应体系： <table><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></table> 引物 <table><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></table> 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)

	<div>1. 按下表配制 RT 反应体系：</div> <table><tr><td>对照 RNA 模板(0.5 ug/uL)</td><td>2 uL</td></tr><tr><td>引物</td><td></td></tr><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> 或对照专用引物</td><td>2 uL</td></tr><tr><td>RNase-free 水</td><td>补水到 13 uL</td></tr></table> <div>2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。</div> <div>3. 再加入 5 uL RT Buffer（含标记 dNTP，本试剂不提供）。</div> <div>4. 37℃保温 5 分钟。如果使用随机引物，则保温温度只能是 25℃。</div> <div>5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20uL。</div> <div>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）。</div> <div>7. 加 1uL 0.5M EDTA，放置在冰上待用。</div> <div>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）。</div>	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
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												
关联产品	两管式 RT-PCR 试剂盒（CAT#：80206）												