

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	<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。 																					
规格及成分	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成份</th><th style="text-align: center;">编号</th><th style="text-align: center;">十块盒包装</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">MMLV (含 RI)</td><td style="text-align: center;">60906A</td><td style="text-align: center;">100 uL</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">RT Buffer (含 dNTP)</td><td style="text-align: center;">60906B</td><td style="text-align: center;">250 uL</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">Oligo (dT)₁₈ 引物(0.5 ug/uL)</td><td style="text-align: center;">100814</td><td style="text-align: center;">50 uL</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">随机引物(0.2 ug/uL)</td><td style="text-align: center;">100409</td><td style="text-align: center;">50 uL</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">RNase-free 水</td><td style="text-align: center;">80403</td><td style="text-align: center;">1 mL</td></tr> <tr> <td style="text-align: center;">使用手册</td><td></td><td style="text-align: center;">1 份</td></tr> </tbody> </table>	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
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	<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" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">RNA 模板</td><td style="padding: 5px;"></td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">总 RNA</td><td style="padding: 5px;">100-500 ng</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">或 poly(A) mRNA</td><td style="padding: 5px;">10-500 ng</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">或专一的 RNA</td><td style="padding: 5px;">0.01 pg-500 ng</td></tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">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" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">Oligo (dT)₁₈(0.5 ug/uL)</td><td style="padding: 5px;">1 uL</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">或随机引物(0.2 ug/uL)</td><td style="padding: 5px;">1 uL</td></tr> <tr> <td style="padding: 5px;">或 RNA 模板专一性引物</td><td style="padding: 5px;">15-20 pmol</td></tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">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 style="padding: 5px;">RNase-free 水</td><td style="padding: 5px;">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°C 保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45°C 保温 5 分钟。如果使用随机引物，则改成 25°C 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°C 保温 60 分钟（但如果使用随机引物，需要先 25°C 保温 10 分钟，然后再转移到 42°C 保温 60 分钟）。此步为 RT 反应。
7. 70°C 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°C 保温 5 分钟后立即冰浴。
3. 再加入 5 uL RT Buffer (含 dNTP)。
4. 37°C 保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45°C 保温 5 分钟。如果使用随机引物，则改成 25°C 5 分钟)。
5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶 (含 RI)，反应终体积为 20uL。
6. 42°C 保温 60 分钟（但如果使用随机引物，需要先 25°C 保温 10 分钟，然后再转移到 42°C 保温 60 分钟）。此步为 RT 反应。
7. 70°C 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°C 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)

	<p>1. 按下表配制 RT 反应体系:</p> <table border="1"> <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> <p>2. 70°C 保温 5 分钟后立即冰浴。</p> <p>3. 再加入 5 uL RT Buffer (含标记 dNTP, 本试剂不提供)。</p> <p>4. 37°C 保温 5 分钟。如果使用随机引物, 则保温温度只能是 25°C。</p> <p>5. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶 (含 RI), 反应终体积为 20uL。</p> <p>6. 42°C 保温 60 分钟 (但如果使用随机引物, 需要先 25°C 保温 10 分钟, 然后再转移到 42°C 保温 60 分钟)。</p> <p>7. 加 1uL 0.5M EDTA, 放置在冰上待用。</p> <p>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)。</p>	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)												