

## 第一链 cDNA 合成试剂盒

地址：上海市浦东新区张江高科技园蔡伦路 720 号 2 号楼

Novoprotein（目录号：E041）

电话：021-50798060，邮箱：product@novoprotein.com.cn

### 一、产品描述：

第一链cDNA合成试剂盒是以mRNA或者总RNA为模板，高效合成第一链cDNA。本试剂盒使用M-MuLV反转录酶（E020），它的RNA酶H的活性与AMV反转录酶相比较低。该反转录酶可耐受42-50℃温度。试剂盒中含有重组RNA酶抑制剂（E055），可耐受55℃高温，有效防止RNA降解。试剂盒同时含有Oligo(dT)<sub>18</sub>，只以有poly(A)尾巴的mRNA为模板合成cDNA，使用本试剂盒也可采用序列特异性引物。合成的第一链cDNA能直接用作PCR或荧光定量PCR的模板，第二链cDNA的合成或线性RNA扩增，也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验。

### 二、产品包装：

第一链 cDNA 合成试剂盒	20 次	100 次
M-MuLV 反转录酶 (200 U/μl)	25 μl	120 μl
RNA 酶抑制剂(20 U/μl)	25 μl	120 μl
5×Reaction Buffer	150 μl	500 μl
dNTP (10mM)	50 μl	250 μl
Oligo(dT) <sub>18</sub> (100 μM)	25 μl	120 μl
GAPDH正向引物(10 uM)	20 μl	20 μl
GAPDH反向引物(10 uM)	20 μl	20 μl
Water, nuclease-free	2x1.25 ml	2x1.25 ml

### 三、存储条件：

-20℃ 保存。

### 四、操作方法：

#### I. 第一链 cDNA 合成

融化后，将试剂盒中各组分混匀并稍微离心，离心后置于冰上。

1. 按顺序加入下面的反应物。

仅供科研使用，不能应用于人体

技术咨询电话：400-600-0940 www.sinobio.net

## 第一链 cDNA 合成试剂盒

地址：上海市浦东新区张江高科技园蔡伦路 720 号 2 号楼

(Novoprotein 目录号：E041)

电话：021-50798060，邮箱：product@novoprotein.com.cn

模板 RNA	总 RNA (0.1 ng - 5 µg) poly(A) mRNA (10 pg - 0.5 µg) 特异性 RNA (0.01 pg - 0.5 µg)
引物	Oligo (dT) <sub>18</sub> 引物 1 µl 随机六聚体引物 1 µl 基因特异性引物 15-20 pmol
5×Reaction Buffer	4 µl
RNA 酶抑制剂(20 U/µl)	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
M-MuLV 反转录酶(200 U/µl)	1 µl
Water, nuclease-free	至 20ul

2. 可选优化步骤。如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构，可先将模板和引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65 °C 孵育 5 分钟，冰上冷却，离心，再置于冰上冷却。

3. 轻轻混匀，离心。

4. 如果使用 Oligo(dT)<sub>18</sub> 或者基因特异型引物，42 °C 孵育 60 分钟。

如果使用随机六聚体引物，25 °C 先孵育 5 分钟，随后 42 °C 孵育 60 分钟。

5. 70 °C 加热 5 min 终止反应。

反应产物可直接用于 PCR 反应或者在 -20 °C 保存少于一周的时间。如想延长保存时间，建议使用 -70 °C 保存。

## II. 第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链 cDNA 可直接用于 PCR 或 qPCR。第一链 cDNA 反应液体积不能超过 PCR 反应体系的 1/10。通常 50 µl 的 PCR 反应体系中，第一链 cDNA 反应液加入 2 µl。

## 五、注意事项：

1. 用 DEPC 处理实验用到的所有管子和枪头，或者购买已经证明无核酸酶的实验用具，整个实验过程戴手套并经常更换手套，避免 RNA 酶的污染。
2. 确保所用试剂及超纯水中无 RNA 酶污染。
3. 试剂盒如不使用，要严格密封保存。在反转录过程中，所有管子要确保扣严。
4. 纯化过的 RNA 要保证不含有盐，金属离子，乙醇和苯酚，因为以上成分会干扰第一链 cDNA 的合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除掉痕量污染物。

仅供科研使用，不能应用于人体

技术咨询电话：400-600-0940 www.sinobio.net