

#J10007

First-Strand cDNA Synthesis SuperMix

□ 50rxn (20 ul reaction)



Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.abmart.cn

产品描述

First-Strand cDNA Synthesis Kit 是基于 Reverse Transcriptase 从 Total RNA 或 Poly(A)+RNA 合成第一链 cDNA 的试剂盒。Reverse Transcriptase 是在 M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase 基础上经过基因工程 改造后获得的全新逆转录酶，相较而言 Reverse Transcriptase 降低了 RNase H 活性且大幅度提高了热稳定性。 Reverse Transcriptase 可耐受更高的反应温度，适用于具有复杂二级结构的 RNA 模板的逆转录。此外，Reverse Transcriptase 增强了与模板的亲合力，适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录，可合成长达 12.3 kb 的第一链 cDNA。First-Strand cDNA Synthesis Kit 包含合成第一链 cDNA 所需的所有组分，并提供 Random Primers 和 Oligo (dT)23VN 两种 cDNA 合成引物。可根据实验需要选择 Random Primers、Oligo (dT)23VN 或基因特异性引物作为逆转录引物，合成的第一链 cDNA 产物可用于后续的 PCR 扩增、qPCR 反应等实验。

产品组分及储存条件

Components	50 rxn (20 µl reaction)
RNase Free ddH ₂ O	1 mL
5 X SuperMix	200 µl
Random Primers (50 µM)	50 µl
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 µM)	50 µl
5 X control Mix	20 µl

将所有组分存放在-20℃并避光保存。尽可能避免反复冻融。

第一链 cDNA 合成步骤

1. RNA 变性：在 RNase-free 的 PCR 管中配制如下混合液；65℃ 加热 5 min，反应结束迅速置于冰上冷却 2 min，短暂离心。

Component	Volume
Oligo (dT)23VN (50 µM) or Random Primers (50 µM) or Gene Specific Primers (2 µM)	1 µl
Total RNA (1 pg to 5 µg) or Poly(A)+ RNA (1 pg to 500 ng)	X µl
RNase-free Water	Up to 10 µl

*Note: RNA 变性步骤可选，RNA 变性有助于打开二级结构，提高逆转录效率；对长度超过 3 kb 的 cDNA 片段，请勿省略该步骤。

2. 按下表配制逆转录反应体系:

Component	Volume
上述变性后反应液	10 μ l
5 x SuperMix	4 μ l
RNase-free Water	Up to 20 μ l

Control 反应(可选): Control 反应是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应。若逆转录产物将用于后续 qPCR 实验, 可用 Control 反应检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

Component	Volume
模板 RNA	Total RNA: 1 pg - 1 μ g
5 x control Mix	4 μ l
RNase-free Water	Up to 20 μ l

3. 轻轻混匀上述反应物, 瞬时离心, 按下表设置逆转录程序:

Temperature	Time
25°C *a	2 min
42-50°C *b	50 min
75°C	15 min

*Note:a. 如果使用的是 Random Primers, 则需要设置此步骤; 如果使用的是 Oligo (dT)23VN 或 Gene Specific Primers 则可省略此步骤。 b. Reverse Transcriptase 对具有复杂二级结构的 RNA 模板仍仍具有良好的扩增能力, 因此通常建议在 42°C 进行反应。当使用特异性下游引物进行逆转录时, 可能会因错配而扩增出非特异性产物, 此时可在 45-50°C 进行反应以便减少非特异性扩增。

4. 得到的逆转录产物可立即用于后续 PCR 或 qPCR 反应, 也可分装后于-20°C 短期保存, -80°C 长期保存, 避免反复冻融。

*Note: 如果使用合成的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 模板加入量会对 PCR 的扩增效率有影响, 其加入量为 PCR 反应液量的 1/10 以下; 在 RT-PCR 反应中, 如果有非特异性扩增或无扩增产物时, 可将第一链 cDNA 合成反应液用 RNase H 处理 (如加入 1 μ l RNase H 到合成反应液 37°C 孵育 20 min)。

引物选择

1. 如果模板来源于真核生物, 建议选择 Oligo (dT)23VN, 该引物可与真核生物 mRNA 的 3' Poly(A)尾配对, 获得最高产量的全长 cDNA; 如果模板来源于原核生物, 建议选择 Random Primers 或 Gene Specific Primers。
2. 当后续实验为 qPCR 时, 可以将 Oligo (dT)23VN 与 Random Primers 1:1 混合使用, 可提高 qPCR 结果的真实性和重复性。
3. Random Primers 特异性最低、适用性较广, mRNA、rRNA、tRNA 和 LncRNA 等模板均可用 Random Primers 进行逆转录。一般 2 kb 以下的 cDNA 合成时 Random Primers 的使用量为 1-2 μ l; 2 kb 以上的 cDNA 合成时 Random Primers 的使用量为 0.4-1 μ l。
4. 当模板具有复杂二级结构或 GC 含量较高时, 使用 Oligo (dT)23VN 或 Gene Specific Primers 无法有效引导 cDNA 合成时, 可使用 Random Primers 为引物。/3/www.apexbt.com 5. Gene Specific Primers 特异性最高。但有些情况下 Gene Specific Primers 无法有效引导第一链 cDNA 合成。可改用 Oligo (dT)23VN 或 Random Primers 重新进行逆转录。

注意事项

1. 实验在冰上操作, 过程中避免 RNase 污染。
2. RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量, RNA 提取过程应注意防止 RNA 降解。