#J10002

First-Strand cDNA Synthesis Kit

☐ 50rxn (20 ul reaction)

Abmart

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 增强了与模板的亲和力，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)
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	50 µl
5X First-Strand Buffer	200 µl
RNase Inhibitor, Murine(40 U/µl)	50 µl
10 mM dNTP Mixture	50 µl
RNase-free Water	1ml
Random Primers (50 µM)	50 µl
Oligo $(dT)_{23}$VN (50 µM)	50 µl

将所有组分存放在 20 C 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°C 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
10 mM dNTP Mixture	1 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。

For in vitro research use only and not intended for use in humans or animals.

2. 按下表配制逆转录反应体系：

Component	Volume
上述变性后反应液	10 μl
5X First-Strand Buffer	4 μl
RNase Inhibitor, Murine(40 U/μl)	1 μl
Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 μl
RNase-free Water	Up to 20 μl

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 μl 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 μl；2 kb 以上的 cDNA 合成时 Random Primers 的使用量为 0.4-1 μl。
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。

For in vitro research use only and not intended for use in humans or animals.