

使用说明书

GeneCopoeia™

Expressway to Discovery

GeneCopoeia Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874
USA
Tel: 301-515-6982; 1-866-360-9531
Fax: 301-515-6983
Web: www.genecopoeia.com

First Strand cDNA Synthesis Kit

产品套装编号: C0210A

产品内容	产品编号	包装规格
M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H ⁻)	C02010A	50 µl (200 U/µl)
5×RT Reaction Buffer	C02011A	250 µl
RNase Inhibitor	C10200A	50 µl (25 U/µl)
25mM dNTP	C10011A	50 µl
60 µM Oligo(dT) ₁₈	C10210A	50 µl
250 µM Random Primer	C10220A	50 µl
ddH ₂ O (DNase/RNase Free)	C10230A	1 ml

储存条件: -20℃保存

■ 产品概述:

RNA逆转录成的单链cDNA是基因克隆和RNA研究的主要材料。本产品是采用莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus) 逆转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase)来合成单链cDNA的专用试剂盒。由于阻碍cDNA长链合成的RNase H 活性的缺失, 使得M-MLV具有比野生型更强的依赖RNA的DNA聚合酶延伸能力。

本产品中已包含有反应所需的所有试剂, 用户只需提供RNA样品就可以进行逆转录实验。

■ 注意事项:

1. 本试剂盒应在-20℃储存。
2. 用前应缓慢颠倒混匀试剂, 避免起泡, 并经轻微离心后再使用。
3. 为避免RNase污染, 提高逆转录效率, 请按照使用说明书来进行逆转录实验。

■ 操作流程:

1. First Strand cDNA合成前准备

为避免RNase对RNA的降解, 提高逆转录效率, 在实验前需准备高温高压灭菌的微量离心管和移液枪头。实验操作时, 需戴口罩和一次性橡胶手套。所有反应液的配制等操作都需在冰上进行。

2. First Strand cDNA合成流程 (例)

1) 融解反应所需的试剂, 上下轻微颠倒混匀, 短暂离心后放置冰上待用。

2) RNA-Primer Mix的配制

在放置于冰上的RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积13µl

试剂组分	体积	终浓度
total RNA 或		1 µg
Poly(A) mRNA		10 ng
60 µM Oligo(dT) ₁₈ 或	1 µl	2.4 µM
250 µM Random Primer 或	1 µl	10 µM
10 µM Sequence-Specific Primer	1 µl	0.4 µM
ddH ₂ O (DNase/RNase Free)		至总体积13 µl

※ 在一个反应中模板的使用量可以适当调整: total RNA可调整在10 ng到5 µg之间, mRNA可调整在1 ng到100 ng之间。

※ 引物选择请按照实验设计要求, 一般只需要选择Oligo(dT)₁₈、Random Primer和Sequence-Specific Primer三种中的一种即可。

3) RNA预变性

混匀RNA-Primer Mix，短暂离心，于70℃保温5分钟后立即放置冰上，有助于减弱RNA二级结构对逆转录的影响，从而提高逆转录效率。

4) 配置逆转录反应液

在RNA-Primer Mix反应管内加入以下试剂至总体积25 μ l。

试剂组分	体积	终浓度
RNA-Primer Mix	13 μ l	
5 $\times$ RT Reaction Buffer	5 μ l	1 $\times$
25 mM dNTP	1 μ l	1 mM
25 U/ μ l RNase Inhibitor	1 μ l	25 U
M-MLV RTase (RNase H ⁻)	1 μ l	200 U
ddH ₂ O (DNase/RNase Free)	4 μ l	
总体积	25 μ l	

5) 逆转录反应

混匀反应Mix，短暂离心后按要求进行反应：如反应液中添加的为Random Primer，反应条件设置为37℃反应1小时；如反应液中添加的为Oligo(dT)₁₈或Sequence-Specific Primer，反应条件设置为42℃反应1小时。

6) 灭活并保存逆转录产物

反应结束后，85℃灭活处理5分钟，最后-20℃保存逆转录产物。

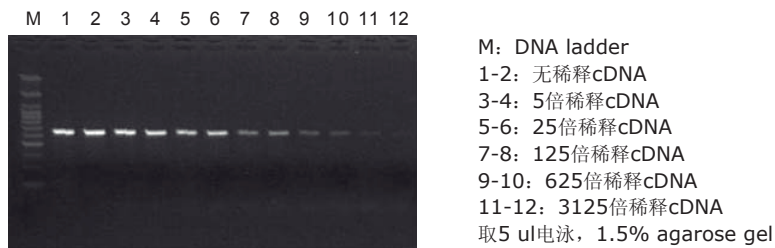
7) PCR 反应

First Strand cDNA 不需要纯化即可进行下游PCR反应。一般取0.5到2 μ l First Strand cDNA作为模板添加到25 μ l 常规PCR反应体系中；如果是Real-Time PCR，建议添加稀释一定倍数的First Strand cDNA，一般取5 μ l稀释了10~20倍的First Strand cDNA作为模板添加到20 μ l Real-Time PCR 反应体系中。

■ 实验示例:

- 实验目的：通过常规PCR的方法来检测梯度稀释人源肝组织total RNA的逆转录产物中GAPDH的含量，来验证逆转录的效率，GAPDH扩增片段长度为550 bp。
- 操作流程：
 - 1) 参考用First Strand cDNA Synthesis Kit的操作流程，用Oligo(dT)₁₈逆转录1 μ g human liver total RNA。
 - 2) 得到的First Strand cDNA 按照5的倍数稀释5倍、25倍、125倍、625倍、3125倍及不稀释cDNA 共六个梯度，每个取1 μ l进行PCR。
 - 3) 利用常规PCR（采用Super Taq DNA Polymerase）扩增30 cycles得到550 bp左右的GAPDH来验证逆转录效率。

结果如下：



3 实验结论

从常规PCR的结果发现：逆转录产物稀释3125倍后还能扩增出较明显的PCR条带，说明其具有良好的逆转录效率。

授权生产厂商：广州复能基因有限公司



复能基因
FulgenGen

地址:广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663
客服电话:020-32068595 电子信箱:support@fulengen.com 网址:www.fulengen.com