

cDNA 第一链合成预混试剂

产品编号 规格

MRT6104-2	20 rxn
MRT6104-5	50 rxn

保存条件及效期：

-20℃，保质期一年。

产品描述：

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步实验设计的高灵敏度反转录反应预混体系，可以从极低量的总 RNA 或 poly(A) mRNA 合成第一链 cDNA，无需额外添加 RNase 抑制剂(已预混在 RT Mix 中)，合成的 cDNA 产量更高，长度可达 15 kb。使用方便，对后续的 PCR 或定量 PCR 实验兼容性好，适合于各种耐热 DNA 聚合酶。

产品组分：

组分名称	MRT6104-2	MRT6104-5
RT Mix 溶液 A	20 ml	50 ml
2×Reaction Mix	200 ml	500 ml
Oligo (dT)18 (50 μM)	20 ml	50 ml
Random Primer (50 μM)	20 ml	50 ml
DEPC-ddH ₂ O	1 ml	2.5 份

使用方法：

A. 注意事项：

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂，使用之前请完全溶解并充分混匀，以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用，因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。

产品说明书 (TECHNICAL DATA SHEET)

4. 由于所有的 RNA 提取方法都不能完全去除基因组 DNA，所以应根据后续实验的需求，选择是否需要在反转录反应前去除残留基因组 DNA。
5. RT Mix 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA，其起始位点由所用引物所决定：
 - 1) 随机引物(Random Primer)在 RNA 模板上没有特异性结合位点，所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板；
 - 2) OligodT Primer 只能以 poly(A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板；
 - 3) 采用序列特异性引物(Gene SpecificPrimer)以其结合位点为起始位点。
6. RT Mix 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增，但加入体积不应超过 PCR 反应总体系的 10%，否则可能影响目的片段的产量。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
7. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板，合成含各种标记的 cDNA，作为杂交实验的探针。
8. RNA 可置于-70℃以下长期保存，cDNA 合成产物可置于-20℃保存。

B. 操作流程：

1. 按照下表配制反应体系

组分	体积
RNA 模板	1~5μg 总 RNA 或 0.1~0.5μgpoly(A)mRNA
Oligo (dT) ₁₈ (50μM)	1μl
或者 Random Primer (50μM)	1μl
2×Reactionmix	10μl
RT Mix	1μl
DEPC-ddH ₂ O	补足至 20μl

对于复杂 RNA 模板，或为了获得更高的合成效率，建议将 RNA 模板、引物与 DEPC-ddH₂O 混匀，65℃孵育 5 分钟，打开 RNA 的二级结构；再立即冰浴 2min，然后再加入其它反应组分。

2. 轻轻混匀，短暂离心；

如用 Oligo (dT)₁₈ (50μM)，42℃孵育 50min。

如用 Random Primer (50μM)，25℃孵育 10min，42℃孵育 50min。

注：如果合成的 cDNA 用作 qPCR 模板，则反应时间可以缩短为 42℃孵育 30min。

3. 85℃加热 5 分钟失活 RT Mix。
4. 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。



补充说明：

以下流程为选做步骤，请根据实验情况酌情选择

1. RNase-free DNase I 处理 RNA 模板的方法：

1) 在 DNase I, RNase-free 离心管中加入下列试剂：

RNA	2-5μg
10×DNase I buffer	1μl
DNase I (2 U/μl)	0.5 μl
RNase Inhibitor	0.25 μl
DEPC-ddH ₂ O	补足至 10μl

2) 混匀，短暂离心，37°C放置 30 分钟；

3) 加入 1 μl 50mM EDTA，65°C放置 15 分钟使 DNase I 失活;或者直接使用酚/氯仿抽提去除 DNase I；

4) 为避免干扰反转录体系，RNA 加入量最好不超过反转录体系的 1/5，如果 RNA 浓度过低，建议沉淀浓缩后使用。

2. 去除第一链 cDNA 合成产物中的 RNA 方法：

1) 加入 0.5 μl RNase H，混匀，30°C反应 20 分钟，70°C放置 20 分钟；

2) 取 5 μl RNase H 处理的 cDNA，加入 95 μl ddH₂O(即稀释 20 倍)；

3) 取 2 μl 稀释后的 cDNA 作为模板用于 PCR 扩增。