cDNA 第一链合成预混试剂

产品编号	规格
MRT6102-2	20 rxn
MRT6102-5	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 RT-PCR 反应系统 ,可以从极低量的总 RNA 或 poly(A) mRNA 合成第一链 cDNA，并能够通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板。该试剂盒使用重组表达的 Script II M-MuLV Reverse Transcriptase (RTase)，通过多点定点突变去除了 RNase H 的活性（RNase H - ），并增加了该酶与模板 - 引物之间的亲和力，具有更好的热稳定性，因此其 DNA 聚合酶的活性和持续合成能力均高于野生型的 M-MuLV RTase，合成的 cDNA 产量更高，长度可达 15 kb。本试剂盒含有第一链 cDNA 合成所需的全部试剂，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	MRT6102-2	MRT6102-5
Script II RTase (200 U/μl)	20 μl	50 μl
5×RTase buffer*	120 μl l	300 μl
RNase Inhibitor	12 μl	30 μl
Oligo $(dT)_{18}$ (50 μM)	20 μl	50 μl
Random Primer (50 μM)	20 μl	50 μl
10 mM dNTP Mix	30 μl	75 μl
DEPC-ddH_2O	1 μl	2.5 μl

* 5RTase buffer：250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl2, 50 mM DTT

活性定义：

以 poly(rA)为模板，oligo(dT)为引物，在 37℃条件下，10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 所需要的酶量定义为一个活性单位(U)。

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。
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。RNase-free DNase I (货号 A216-01) 处理的具体方法见本说明书附录。
5. Script II RTase 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) Oligo dT 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 Specific Primer) 以其结合位点为起始位点。

6. Script II RTase 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． 在 DNase/RNase-free 离心管中加入下列成分：

组分	体积
5×RT buffer	4 µl
RNase Inhibitor (RNaseIn)	0.5 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
RNA 模板	≤8 µl (1~5 µg 总 RNA 或 0.1~0.5 µg poly(A) mRNA)
引物※	1 µl (50 µM Oligo dT Primer；50 µM Random Primer 或 20 µM 序列特异性引物)
StarScript II RTase	1 µl
DEPC-ddH_2O	补足至 20 µl

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-ddH_2O 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_2O	补足至 10μl

2) 混匀，短暂离心，37℃放置 30 分钟；

3) 加入 1 μl 50mM EDTA，65℃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℃反应 20 分钟，70℃放置 20 分钟；

2) 取 5 μlRNase H 处理的 cDNA，加入 95 μl ddH_2O(即稀释 20 倍)；

3) 取 2 μl 稀释后的 cDNA 作为模板用于 PCR 扩增。