PCR 反应

1. 取 10%第一链反应液（2μl)转移到合适的无菌薄壁 PCR 管中。注意：制备的第一链反应液可以不纯化直接用作 PCR 模板，用量为 1-5μl。如使用过量，第一链反应液中的盐和 Random primers 将会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。如果有必要将第一链反应液纯化，可按下列方式纯化：cDNA 合成反应结束后，在反应体系中加入 RNase A, 37℃保温 10 分钟，用 DP1501 回收 cDNA。

2. 按次序加入下列试剂：

5μl	10X PCR Buffer
1μl	10mM dNTP mix
1μl	10μM Primer #1 (用户自备)
1μl	10μM Primer #2 (用户自备)
xμl	H_20 (使反应总体积为 49 μl)
1μl	Taq DNA polymerase

3. 混匀，如需要可在在液面上加 50μl 矿物油(一至两滴)。

4. 扩增反应。根据用户引物的退火温和所扩增基因在原组织或细胞中的拷贝数，参考 Taq DNA polymerase 的技术参数，设定扩增条件。具体说明参见 Taq DNA 聚合酶说明书。通常循环 30-35 次。

5. DNA 扩增产物用 Agarose 电泳和 EB 染色观测。

BioTeke

北京百泰克生物技术有限公司

BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781　　传真：010-62951781

网 址：www.bioteke.com　　Email:info@bioteke.com

BioTeke

北京百泰克生物技术有限公司

BioTeke Corporation

Fast Super RT Kit cDNA
第一链合成试剂盒（with gDNase）

货号： PR6101 (50次) 20ul体系

PR6102 （200次） 20ul体系

储存：-20℃可以储存一年

产品描述：

本试剂盒是一种高效快速并可以去除基因组DNA污染的反转录系统，其包含了gDNase，反转录酶M-MLV。gDNase可以有效地去除RNA中的DNA，有效避免Total RNA中的DNA的污染，保持了RNA的完整性.M-MLV具有高效的逆转录酶活性，可以成功合成cDNA第一链，合成效率高达90%以上。本试剂盒优化了逆转录反应液，反应的模板量（Total RNA）可在0.2-2μg范围之间进行逆转录反应。合成的第一链cDNA可广泛用于2nd Strand的合成、杂交、PCR扩增、Real-Time PCR反应等。本品还具有与RNA模板高亲和性的特点，其能通读GC含量高，二级结构复杂的RNA模板。

产品特点及应用范围

① 反转录效率高，反转录效率可达90%以上。

② 操作简单快捷。

③ 通读复杂模板，能通读GC含量高，二级结构复杂的RNA模板。

④ 后续兼容性好，能够配合荧光定量检测产品，灵敏度高，稳定性好。

⑤ 应用于PCR, qPCR等。

⑥ 有全新高效的gDNase，3min高效去除gDNA

⑦1ul的gDNase可消化1ug的DNA。

产品组成：

组分名称	50次（PR6101）	200次（PR6102）
gDNase	50ul	200ul
10×Buffer	50ul	200ul
Stop Buffer	50ul	200ul
2×Reverse transcriptase Mix	500ul	2ml
Oligo(dt) Primer	50ul	200ul
Random primer	50ul	200ul
RNAfree water	1ml	4ml

操作步骤1:（RNA消化实验操作步骤）

1、先在冰浴上配置消化反应液，体系如下：

gDnase	1ul
10×Buffer	1ul
Total RNA	约1ug
Rnase-free H_2O	up to 10ul

注:消化RNA中的DNA时，如果DNA含量超过1ug，加RNA时体系应适当的减少。

在 PCR 仪上或者水浴上 42℃ 2min

2、然后取出加入 1ul 的 Stop Buffer 在 PCR 仪上或者水浴上 65℃ 2min 后取出以备逆转录使用。

操作步骤 2（反转录试验操作步骤）

1．按以下组分配制反转录反应液

Total RNA or Poly(A) RNA	0.2-2μg
Reverse transcriptase MIX	10ul
Oligo(dt) Primer	1ul
或 Random primer	1ul
H2O	up to 20ul

2. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应：

①50C，20-50min；**(根据客户本身所需cdna的量来决定反转录的时间，时间到50min时反转录cdna最彻底，cdna的浓度也就越高)。**

② 72℃ ，2min；

注：（当PCR反应有非特异性扩增时可将反转录温度升到50℃）

得到的cDNA可以直接用于后续的PCR等反应，也可以-20℃冻存以备以后使用。

注意事项：

1. 用于 cDNA 合成的溶液试剂尽可能的 DEPC 进行处理，并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时，首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后，再将溶液进行过滤除菌处理。
2. Dnase 中不含 RNA 酶抑制剂，要谨慎操作，注意 Rnase 酶的污染。
3. 避免反复多次冻融 RNA，以避免 RNA 的降解。
4. 试剂盒各组成成分应保存在-20° C。
5. cDNA 产物应保存在-20° C。
6. 反转录体系可以根据需要相应扩大。
7. 根据实验需求不同，也可以选用 Oligo-dT Primer 或 Random primer，引物使用量如下：Oligo-dT Primer 50 pmol / 20 μl 反应体系，Gene Specific Primer 5 pmol /20 μl 反应体系。
8. 逆转酶以 RNA 为模板合成第一链 cDNA，RNA 的质量和数量直接影响逆转录的结果，如（模板的完整性、模板的纯度以及模板的加量）。