

版本号：20160001

cDNA 第一链合成/RNA 逆转录试剂盒

货号：A2010A0603

规格：200T

-20℃ 避光保存

试剂盒组成：

试剂	说明	货号	200T
5× Reaction Buffer	含 Mg^{2+} , 300 μ l/支	B0B02-A	4 支
M-MLV 酶	200 Units/ μ l, 200 μ l/支	B0B02-B	1 支
Recombinant Rnasin	40 Units/ μ l, 100 μ l/支	B0B02-C	1 支
通用引物 oligo (dT)	100 μ M, 240 μ l/支	B0B02-D	1 支
随机引物 GPR-6	100 μ M, 480 μ l/支	B0B02-E	1 支
10mM dNTP mix	10 mM, 280 μ l/支	B0B02-F	1 支
RNase-free ddH ₂ O	1.5 ml/支	A2010B0X01	4 支

产品简介：

cDNA 第一链合成试剂盒包括了一种全新高效逆转录酶、反应缓冲液及该实验中必需的反应组分。使用该试剂盒能够以总 RNA 或 mRNA 为模板高效逆转录成互补的 cDNA 第一链，进而开展后继的相关实验。

- 试剂盒可逆转录 0.1 至 10 μ g 的总 RNA；
- 合成的 cDNA 第一链模板用于定量 PCR；
- 合成的 cDNA 第一链模板 -20℃ 可保存一年；

警告：

- 本产品仅供科研使用，勿用于医药、临床、食品及化妆品等其他用途；
- 本产品中部分试剂有腐蚀性或毒性，勿直接接触皮肤或吞咽；
- 操作时请穿戴实验服和手套，如接触皮肤，应立即用大量清水冲洗；
- 误食或其他紧急情况，请及时到医院救治；
- 部分试剂易燃，请注意消防安全。

其他需要自己准备的:

- 已制备的总 RNA 样本;
- 0.6 mL 及 1.5 mL RNase-free Eppendorf 管;
- RNase-free Tips (1000 μ L、200 μ L、10 μ L 的枪头);
- 移液器 (1000 μ L、200 μ L、10 μ L);
- 恒温水浴锅或金属浴
- 冰浴盒

操作步骤:

- 1、提前将试剂盒中试剂及总 RNA 样本放置冰浴, 温度平衡至冰点;
- 2、震荡混匀所有试剂及总 RNA 样本并瞬时离心;
- 3、在每个 0.6 ml Rnase-free Eppendorf 管中加入 1-2 μ g 的总 RNA 样本;
- 4、每管加入 0.8 μ l OligoDT 以及 1.6 μ l 随机引物 GPR-6, 补充适量的 DEPC 水至总体积达 10 μ l; (如所有样本 RNA 量相近, 无需通过体积调整 RNA 量均一, 这步也可计算配制总管预混后分装)
- 5、震荡混匀后瞬时离心;
- 6、恒温金属浴 70 $^{\circ}$ C 温育 5 mins, 冰浴备用;
- 7、按下表配置 RT 反应液, 震荡混匀;

下表为 1 份样本的量, 如需要逆转录 n 份的 RNA, 请配置 n+1 份进行分装:

M-MLV5 \times Reaction Buffer(含 Mg ²⁺)	4 μ l
10mM dNTPmix	1 μ l
Recombinant Rnasin	0.3 μ l
M-MLV	0.8 μ l
RNase-free ddH ₂ O	3.9 μ l
共计	10 μ l

- 8、在冰浴后的每个离心管中加入 RT 反应液 10 μ l, 此时离心管内总体积为 20 μ l;
- 9、震荡混匀后瞬时离心;
- 10、恒温金属浴中 42 $^{\circ}$ C 反应 60 mins;
- 11、cDNA 产物应置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

其他注意事项:

- 本试剂盒可逆转录合成体系为 20 μ l 的 cDNA 样本，如需要加大体系，可等比例增加加入试剂量；（例：合成 100 μ l 的 cDNA，所有试剂加入量乘以 5 倍）
- 本试剂盒试剂额外损耗相对较大，建议客户根据自身样本数量订购相应规格的试剂盒，以免出现试剂浪费或不足现象；
- 总 RNA 量建议大于 100 ng，以保证 cDNA 得率；
- 样本中建议避免有机物或酚污染，以保证逆转录效率；
- M-MLV 和 Recombinant Rnasin 含有甘油，在 -20 $^{\circ}$ C 条件下是液体，保存时间为 1 年，避免保存在 -80 $^{\circ}$ C 导致反复冻融，避免在常温下保存的时间过久影响效价；
- 得到的 cDNA 产物建议直接用 PCR 或者 real time PCR 进行内参验证。

RNA 质量控制:

- 测 O.D 值定量 RNA 浓度，测定 RNA 产物溶液在 A260 和 A280 的 O.D.值，A260/A280 值在 1.7-2.0 之间说明 RNA 提取结果良好。（<1.7 时表明有蛋白质、基因组 DNA 或酚污染，>2.0 时表明可能有异硫氰酸（TRIzol）残存）
- 逆转录 cDNA，将所有样本做一次内参 PCR 以及基因组内含子内参 PCR 预实验，判断 RNA 的量以及基因组 DNA 污染情况。

预防 RNase 污染，应注意以下几个方面:

- 经常更换新手套，以防止 RNase 污染；
- 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染；
- RNA 在 TRIzol、异丙醇、乙醇等试剂中短时间内不会被 RNase 降解，但逆转录过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿（玻璃器皿可在 150 $^{\circ}$ C 烧烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用 DEPC 水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase）；
- 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O（货号 A2010B0X01）；
- 如有环境污染风险，可进入生物安全柜或超净台进行实验。



电话： 4008801880 或 0086 21 51692391 传真： 0086 21 51692391

技术服务专线： 0086 21 54097875-2402,2403

Email: support@biotnt.com

主页： www.biotnt.com

在线支持 QQ 群： 47468567

联系地址： 上海闵行区罗锦路 98 号 502 室 邮编 200010