



cDNA 第一链合成试剂盒

产品简介:

First Strand cDNA Synthesis Kit 是专门设计的高效高灵敏度的 cDNA 第一链合成试剂盒。可以用于两步法 RT-PCR 实验中第一步反应, 样品的总 RNA 或者 mRNA 合成第一链 cDNA。试剂盒中的反转录酶是我公司新开发的 Super M-MLV Reverse transcriptase (RNase H⁻), 该酶是通过重点突变方法使 RNase H 活性缺失, 并增加了酶和模板及随机引物的结合力, 具有更好的稳定型和持续合成能力。且试剂盒中加入了 RNase inhibitor, 最大限度降低总 RNA 或 mRNA 的降解。

产品编号	产品名称	规格
TER016-1	First Strand cDNA Synthesis Kit	25T
TER016-2	First Strand cDNA Synthesis Kit	50T

产品特点:

- 高效高灵敏度。
- 试剂盒中的反转录酶是我公司新开发的 Super M-MLV Reverse transcriptase (RNase H⁻), 该酶是通过重点突变方法使 RNase H 活性缺失, 并增加了酶和模板及随机引物的结合力。
- 试剂盒中加入了 RNase inhibitor, 最大限度的降低总 RNA 或 mRNA 的降解。

体系组分:

		TER016-1	TER016-2
成分	浓度	25T	50T
Super M-MLV Reverse transcriptase RNase H ⁻	50U/μl	25ul	50μl
OligdT(18)	10 μM	25ul	50μl
Random primer	10 μM	25ul	50μl
5×First-strand Synthesis Buffer	5×	100ul	200μl
dNTPs	10 mM	25ul	50μl
RNase inhibitor	40U/μl	50ul	100ul
RNase-free ddH ₂ O		0.5ml	1ml

操作方法:

- 1、在 0.2ml 的 PCR 管 (DEPC 处理) 中加入以下反应体系

总 RNA/mRNA	1~5μg /0.05~0.5μg
OligdT(18)或 Random primer	1μl
dNTPs	1μl
5×First-strand Synthesis Buffer	4μl
Super M-MLV Reverse transcriptase RNase H ⁻	1μl
RNase inhibitor	2μl
RNase-free ddH ₂ O	补足 20μl



- 2、短暂离心，混匀体系中组份。
- 3、42℃保温 60 min。
- 4、95℃ 5 分钟，4℃ 1-5 分钟，可接着进行后续操作也可迅速放入-20℃长期冻存。

常见问题及参考意见：

cDNA 产量低：

可能原因：（1）RNA 模板质量低；（2）mRNA 浓度过高；（3）反应体系中存在反转录酶抑制剂或反转录酶量不足。

合成不了长链的 cDNA：

可能原因：RNA 降解。对使用的器具、试剂用 DEPC、干热、湿热灭菌处理，杜绝 RNase 污染。本产品为您提供 RNase inhibitor。

注意事项：

- 1、确保 RNA 完整性及纯度。

RNA 质量是决定很成 cDNA 第一链成功的关键因素，其纯度及完整性可由 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值和进行琼脂糖凝胶电泳检测。较纯的 RNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值通常为 1.8-2.0，若比值偏低，应进一步纯化。

- 2、避免 RNA 酶污染。

进行 cDNA 合成所用的器皿、试剂和溶液必须完全无菌。操作过程始终戴手套和口罩以杜绝各种 RNA 酶的污染。用户所使用离心管、吸头均需经过 DEPC 水处理并高压灭菌。

- 3、合成 cDNA 第一链引物的选择。

选择 Oligo(dT)15-25 作为反转录引物，可保证 cDNA 具有完整的 3' 端，通常可接近全长的 cDNA 第一链；若选择随即寡核苷酸(dN)6 或(dN)9 作为引物，引物在整个 mRNA 的多个位点退火，产生短的部分长度的 cDNA 第一链。这种方法常用于获得 5' 末端序列及从带有二级结构区域或带有逆转录酶不能复制的终止位点的 RNA 模板获得 cDNA。

- 4、总 RNA 若有轻微降解，目的基因同样能扩增出来。

- 5、储存：-20℃冻存，至少稳定 18 个月。

- 6、使用之前各组分低速离心，避免挂壁。