

# 第一链cDNA合成试剂盒

**货号：** PMK0832

**保存：** -20°C保存，12个月有效。

**规格：** 20rxn/50rxn/100rxn

**用途：** 用于从mRNA或总RNA模板合成第一链cDNA。

## 产品简介：

第一链cDNA合成试剂盒是一个用于从mRNA或总RNA模板高效合成第一链cDNA的完整系统。该试剂盒使用RevertAid逆转录酶(RT)，其RNase H活性与AMV逆转录酶相比较低。该酶在42-50°C下保持活性，适用于合成最高至13kb的cDNA。试剂盒附带的重组RNase抑制剂可有效保护RNA在高达55°C的温度下降解。本试剂盒合成的第一链cDNA可以直接用于PCR或实时PCR的模板，也可以用于第二链cDNA合成或线性RNA扩增。放射性和非放射性标记的核苷酸可以作为探针将其用于第一链cDNA中用作杂交实验(包括微阵列)。

## 产品内容：

名称	PMK0832(20rxn)	PMK0832(50rxn)	PMK0832(100rxn)
RevertAid RT (200 U/μL)	25ul	60ul	120ul
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	25ul	60ul	120ul
5x Reaction Buffer	100ul	250ul	500ul
10 mM dNTP Mix	50ul	125ul	250ul
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer, 100μM	25ul	60ul	120ul
Random Hexamer Primer, 100μM,	25ul	60ul	120ul
Forward GAPDH Primer, 10μM	5ul	10ul	20ul
Reverse GAPDH Primer, 10μM	5ul	10ul	20ul
Control GAPDH RNA, 0.05μg/μL	5ul	10ul	20ul
Water, nuclease-free	1.25ml	1.25ml	2*1.25ml

## 使用方法：

### 一、模板RNA

本试剂盒适用于通过标准方法分离的总细胞RNA。纯化的RNA必须不含盐、金属离子、乙醇和苯酚，以避免抑制cDNA合成反应。微量污染物可以通过RNA的乙醇沉淀去除，然后用75%的冷乙醇洗涤两次。

对于RT-PCR，模板RNA必须没有DNA污染。在cDNA合成之前，可以用无RNase的DNase I处理RNA以去除痕量的DNA。实验时需设置对照组 (RT-)，该反应包括除逆转录酶外的RT-PCR所有成分。

### 二、RNA样本质量

在cDNA合成之前评估RNA的完整性，最常见的方法是变性琼脂糖凝胶电泳，然后用溴化乙锭染色。如果真核生物总RNA电泳后18S和28S rRNA都出现尖锐条带，则认为RNA模板是完整的。28S rRNA条带的亮度大约是18S rRNA的两倍。rRNA条带的任何拖尾现象都表明mRNA降解。如果发生这种情况，应制备新的总RNA样本。

作为两步法RT-PCR的第一步，合成第一链cDNA需要使用0.1ng-5μg的总RNA或1ng-500ng的poly(A) mRNA。若用于第二链合成和随后的克隆反应，合成第一链cDNA需使用1μg分离的mRNA。

### 三、合成第一链cDNA

解冻后，将试剂盒的各组分短暂离心，在冰上储存。

## 产品说明书

1. 按顺序将以下试剂加入冰上无菌、无核酸酶的PCR管中。

组分		体积
RNA模板	总RNA	0.1ng-5 $\mu$ g
	poly(A) mRNA	10pg-0.5 $\mu$ g
	specific RNA	0.01 pg-0.5 $\mu$ g
Primer	Oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1 $\mu$ L
	或Random Hexamer primer	1 $\mu$ L
	或gene-specific primer	15-20pmol
Water,nuclease-free		to 12 $\mu$ L

2. 如果RNA模板富含GC或含有二级结构，轻轻混合，短暂离心，在65 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。在冰上冷却备用。

3. 按表中顺序向第1步的PCR管继续添加组分。

组分	体积
5X Reaction Buffer	4 $\mu$ L
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ L
RevertAid RT (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L

4. 轻轻混合并短暂离心。

5. 对于使用Oligo(dT)<sub>18</sub> primer 或 gene-specific primer的cDNA合成，在42 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。对于使用Random Hexamer primer的cDNA合成，在25 $^{\circ}$ C下孵育5分钟，然后在42 $^{\circ}$ C下温育60分钟。(注意：对于富含GC的RNA模板，反应温度可以提高到45 $^{\circ}$ C)

6. 在70 $^{\circ}$ C下加热5分钟终止反应。逆转录反应产物可以直接用于PCR，也可以在-20 $^{\circ}$ C下储存不到一周。若需要长期储存，建议于-70 $^{\circ}$ C保存。

### 四、第一链cDNA的PCR扩增

第一链cDNA合成的产物可以直接用于PCR或qPCR。第一链cDNA合成反应混合物的体积不应超过总PCR反应体积的1/10。通常2 $\mu$ L的第一链cDNA合成反应混合物用作后续总体积为50 $\mu$ L PCR的模板中。

应使用阳性和阴性对照反应来验证第一链cDNA合成步骤的结果。逆转录酶阴性对照(RT-)在RT-PCR或RT-qPCR反应中很重要，用于评估RNA样品的基因组DNA污染。对照组(RT-)反应包含除逆转录酶外的所有逆转录反应试剂。无模板阴性对照(NTC)对于评估试剂污染也非常重要，NTC反应包含除RNA模板外的逆转录反应的所有试剂。阳性对照RNA模板和基因特异性引物随本试剂盒一起提供。通过体外转录产生人GAPDH 对照RNA(1.3kb)，设计的GAPDH特异性PCR引物与人、小鼠和大鼠的GAPDH基因互补，并能扩增出496bp的RT-PCR产物。阳性对照的RT-PCR的方案如下。

解冻后，将试剂盒的各组分短暂离心，在冰上储存。

1. 按顺序将以下试剂加入冰上无菌、无核酸酶的PCR管中。

组分		体积
Control GAPDH RNA (50 ng/ $\mu$ L)		2 $\mu$ L
Primer	Oligo(dT) <sub>18</sub> primer 或Random Hexamer primer 或Reverse GAPDH Primer	1 $\mu$ L
5X Reaction Buffer		4 $\mu$ L
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L)		1 $\mu$ L
10 mM dNTP Mix		2 $\mu$ L
RevertAid RT(200 U/ $\mu$ L)		1 $\mu$ L
Water,nuclease-free		9 $\mu$ L
Total volume		20 $\mu$ L

## 产品说明书

- 轻轻搅拌并离心。
- 对于使用oligo(dT)<sub>18</sub> primer或Reverse GAPDH Primer的cDNA合成，在42°C孵育60分钟。  
对于使用Random Hexamer primer的cDNA合成，在25°C下孵育5分钟，然后在42°C下温育60分钟。
- 在70°C下加热5分钟终止反应。短暂离心，然后继续进行PCR扩增。
- 将对照组第一链cDNA合成的产物在无核酸酶的水中以1:1000稀释。
- 所有的PCR试剂解冻后，轻轻涡旋并短暂离心。
- 将薄壁PCR管放在冰上，加入以下试剂。

组分	体积
cDNA from control RT reaction (1:1000稀释)	2 $\mu$ L
10X PCR Buffer	5 $\mu$ L
10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ L (0.2mM each)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ L
Forward GAPDH Primer	1.5 $\mu$ L
Reverse GAPDH Primer	1.5 $\mu$ L
Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Water, nuclease-free	35.5 $\mu$ L
Total volume	50 $\mu$ L

- 在带有加热盖的PCR仪中进行PCR反应。

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	3min	1
变性	94°C	30s	35
退火	58°C	30s	
延伸	72°C	45s	

- 将5-10 $\mu$ L RT-PCR产物点入1%琼脂糖凝胶里。电泳后经溴化乙锭染色，应可见明显的496bp的PCR产物。

### 注意事项:

- 应避免核糖核酸酶污染，RNA的纯度和完整性对于全长cDNA的合成至关重要。RNA可以被RNase A降解，RNase A是一种在任何实验室环境中都能发现的高度稳定的污染物。
- DEPC处理所有用于cDNA合成的PCR管和枪头，或使用经过认证的无核酸酶实验室用品。
- 处理RNA和所有试剂时戴手套，因为皮肤是RNA酶的常见来源。经常更换手套。
- 使用无核酸酶的水或者DPEC水，使用试剂盒里的RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L)保护RNA免受RNase活性的影响。不使用时，保持所有试剂盒组分密封。在逆转录反应过程中，保持所有PCR管盖紧。
- RNA纯化方案中使用的试剂可能留在溶液中并抑制第一链cDNA的合成，例如SDS、EDTA、胍盐、磷酸盐、焦磷酸盐、多胺、亚精胺等。为了去除污染物，用乙醇重新沉淀RNA，并用75%乙醇洗涤沉淀物。
- 使用与RNA模板匹配的正确引物。细菌RNA或没有poly(a)尾部的RNA模板用Random Hexamer primer替代Oligo(dT)<sub>18</sub> primer，确保序列特异性引物与模板RNA的3'端互补。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究使用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。