

天
净
沙
系
列

CAT#:220627-10
低温运输, -20℃保存

BINGENE

一管式双链 cDNA 合成试剂盒

One-Tube ds-cDNA Synthesis Kit

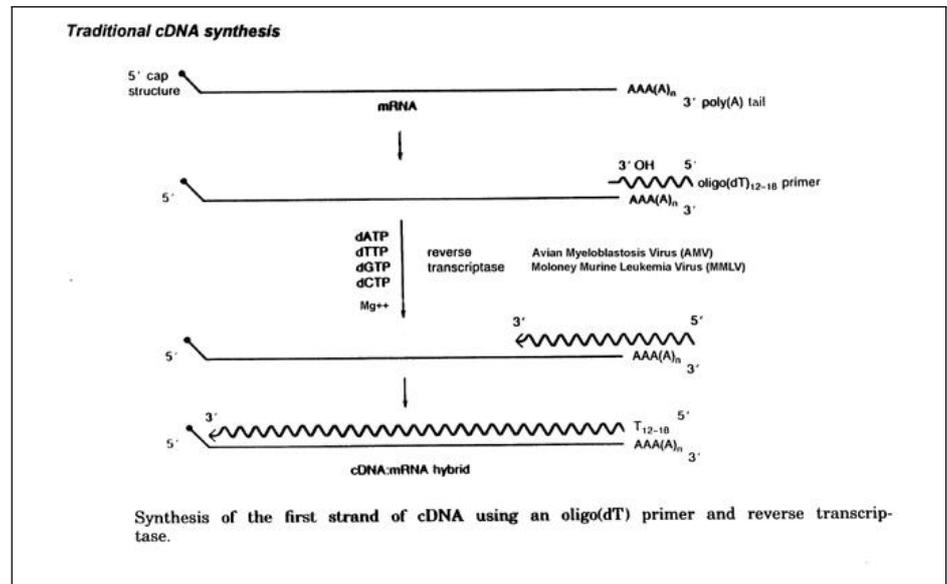
使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

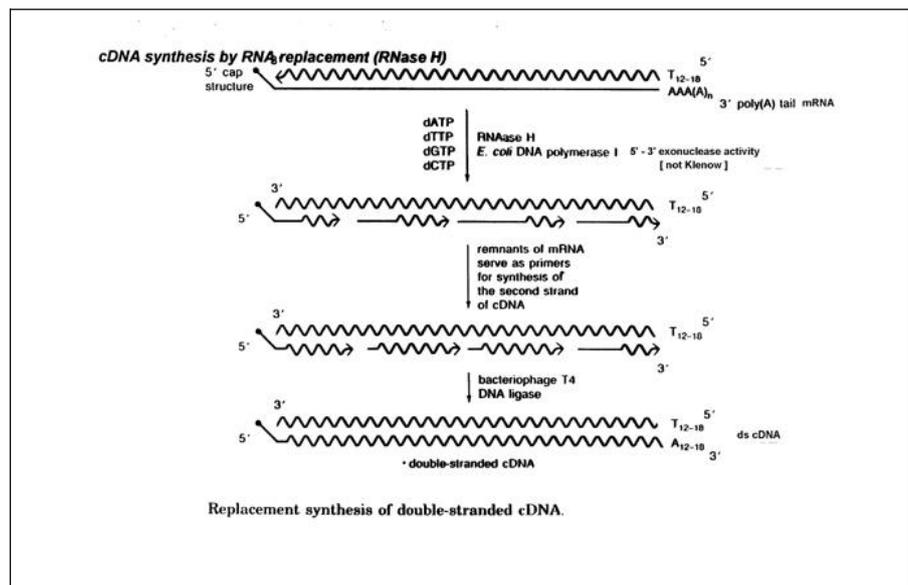
网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点

本产品是用于一管式双链 cDNA 合成的试剂盒。cDNA 第一链合成的原理是以 Oligo dT 为通用引物的、MMLV 催化的逆转录反应。其原理如下：



cDNA 第二链合成的原理是用 RNase H 使 RNA-DNA 杂合链中的 RNA 产生切口，再用 E.coli DNA Polymerase I 的切口平移(nick translation)活性进行 RNA 链取代合成 cDNA 第二链，其原理图如下：



本产品具有下列特点：

1. 即开即用，含有合成两条 cDNA 链的所有试剂，用户只需要提供 mRNA。
2. 一管式进行，第一链 cDNA 合成后不需要任何处理，直接进入第二链的合成。
3. 所得双链 cDNA 可以直接用于后续的常规 PCR、real-time PCR、cDNA 文库构建、抑制性差减杂交等。
4. 本试剂盒足够 10 次 80uL 体系的双链 cDNA 合成反应。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分	本产品使用五孔盒包装																							
	成份	编号	规格	包装材料																				
	cDNA 第一链合成反应液 (含 Oligo-dT 和 dNTP)	220627a	50 uL	0.5mL 绿盖管																				
	MMLV 逆转录酶	11-220628	10 uL	0.5mL 红盖管																				
	5×cDNA 第二链合成反应液	220627b	160 uL	0.5mL 白盖管																				
	20×cDNA 第二链合成 酶混合液	220627c	40 uL	0.5mL 黄盖管																				
	超纯水	210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管																				
	使用手册	220627sc	1 份	无																				
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																							
自备试剂	mRNA 提取试剂盒																							
使用方法	<p>一：mRNA 的制备</p> <p>本试剂盒不提供 mRNA 提取试剂，用户需自备相关试剂。</p> <p>二：双链 cDNA 的合成</p> <p>1. 在一个干净的塑料离心管中，按下表设置 cDNA 合成反应：</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">成分</th> <th style="text-align: center;">用量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">自备样品 mRNA</td> <td style="text-align: center;">4 uL (0.5-2ug)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">cDNA 第一链合成缓冲液 (含 Oligo dT 引物和 dNTP)</td> <td style="text-align: center;">5 uL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">70℃ 2 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">加入 MMLV 逆转录酶</td> <td style="text-align: center;">1 uL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">轻柔吹打混匀后 42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">超纯水</td> <td style="text-align: center;">48 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5×cDNA 第二链合成缓冲液</td> <td style="text-align: center;">16 uL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">20×cDNA 第二链合成酶混合液</td> <td style="text-align: center;">4 uL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">共 80uL。吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. 如果需要将双链 cDNA 平末端化，则需加自备 T4 DNA 聚合酶 2 uL，轻柔吹打混匀后，16℃继续保温 30 分钟。然后进入下一步。如果不需要将 cDNA 平末端化，则直接进入下一步。</p> <p>3. 终止反应：如果后续实验(如电泳)不担心 EDTA 的影响，可以直接加入 4 uL 0.2M EDTA 溶液终止反应，然后将样品放-20℃长期保存。如果后</p>				成分	用量	自备样品 mRNA	4 uL (0.5-2ug)	cDNA 第一链合成缓冲液 (含 Oligo dT 引物和 dNTP)	5 uL	70℃ 2 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心		加入 MMLV 逆转录酶	1 uL	轻柔吹打混匀后 42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA		超纯水	48 uL	5×cDNA 第二链合成缓冲液	16 uL	20×cDNA 第二链合成酶混合液	4 uL	共 80uL。吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时	
成分	用量																							
自备样品 mRNA	4 uL (0.5-2ug)																							
cDNA 第一链合成缓冲液 (含 Oligo dT 引物和 dNTP)	5 uL																							
70℃ 2 分钟后室温放置 2 分钟，短暂离心																								
加入 MMLV 逆转录酶	1 uL																							
轻柔吹打混匀后 42℃保温 90 分钟合成第一链 cDNA																								
超纯水	48 uL																							
5×cDNA 第二链合成缓冲液	16 uL																							
20×cDNA 第二链合成酶混合液	4 uL																							
共 80uL。吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时																								

	<p>续实验（如 PCR 扩增）不担心 cDNA 的单双链状态，可以 95℃ 保温 10 分钟终止反应。如果后续实验既受 EDTA 影响，又不能是单链 DNA，则可以用 PCR 过柱纯化法纯化。</p> <p>4. 电泳 5uL 检测 cDNA 质量。如果 cDNA 在 0.5-10Kb 的范围内呈模糊一片，则 cDNA 合格。如果没看见 cDNA 或有其他异常，需查找原因后再继续。</p> <p>5. 所得 cDNA 可以直接用于后续的常规 PCR、real-time PCR、cDNA 文库构建、抑制性差减杂交等实验。</p>
关联产品	第一链 cDNA 合成试剂盒