

天
净
沙
系
列

CAT#:960906-50
低温运输,-20℃保存

BINGENE

逆转录试剂盒(cDNA 合成试剂盒)

Reverse Transcription 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: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	本试剂盒提供合成 cDNA 第一链（逆转录）所需要的全部试剂。其原理是用突变的莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶(M-MuLV RT)以 RNA 为模板,高效合成 cDNA。它具有下列特点： 1. 使用突变的反转录酶，内源 RNase H 活性低，使得在逆转录过程中 RNA 模板不容易被降解，得到的 cDNA 平均长度更长。 2. 最长可合成 13 Kb 的 cDNA。 3. 可以使用 oligo-dT、随机引物和 RNA 专一性引物三种引物（前两种本试剂盒提供）。 4. 总 RNA、poly(A)+RNA 或特殊 RNA 均可作为模板。 5. 得到的 cDNA 可用于后续的 cDNA 文库构建、RT-PCR、探针标记等。																												
规格及成分	本产品使用五孔盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>MMLV（含 RI）</td><td>960906a</td><td>50 uL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>RT Buffer（含 dNTP）</td><td>960906b</td><td>250 uL</td><td>0.5mL 绿盖管</td></tr><tr><td>Oligo（dT）18 引物(0.5 ug/uL)</td><td>100814</td><td>50 uL</td><td>0.5mL 白盖管</td></tr><tr><td>随机引物(0.2 ug/uL)</td><td>100409</td><td>50 uL</td><td>0.5mL 黄盖管</td></tr><tr><td>RNase-free 水</td><td>80403</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>960906sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	MMLV（含 RI）	960906a	50 uL	0.5mL 红盖管	RT Buffer（含 dNTP）	960906b	250 uL	0.5mL 绿盖管	Oligo（dT）18 引物(0.5 ug/uL)	100814	50 uL	0.5mL 白盖管	随机引物(0.2 ug/uL)	100409	50 uL	0.5mL 黄盖管	RNase-free 水	80403	1 mL	1.5mL 蓝盖管	使用手册	960906sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																										
MMLV（含 RI）	960906a	50 uL	0.5mL 红盖管																										
RT Buffer（含 dNTP）	960906b	250 uL	0.5mL 绿盖管																										
Oligo（dT）18 引物(0.5 ug/uL)	100814	50 uL	0.5mL 白盖管																										
随机引物(0.2 ug/uL)	100409	50 uL	0.5mL 黄盖管																										
RNase-free 水	80403	1 mL	1.5mL 蓝盖管																										
使用手册	960906sc	1 份	无																										
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																												
使用方法	一：合成 PCR 用的 1st-strand cDNA 1. 在一干净的反应管中加入 RNA 模板。注意：RNA 模板不能含有基因组 DNA 污染。 <table><tr><td>RNA 模板种类</td><td>加入量</td></tr><tr><td>总 RNA</td><td>100-500 ng</td></tr><tr><td>或 poly(A) mRNA</td><td>10-500 ng</td></tr><tr><td>或专一的 RNA</td><td>0.01 pg-500 ng</td></tr></table> 2. 加入引物和水 <table><tr><td>引物种类</td><td>加入量</td></tr><tr><td>Oligo（dT）18(0.5 ug/uL)</td><td>1 uL</td></tr><tr><td>或随机引物(0.2 ug/uL)</td><td>1 uL</td></tr></table>	RNA 模板种类	加入量	总 RNA	100-500 ng	或 poly(A) mRNA	10-500 ng	或专一的 RNA	0.01 pg-500 ng	引物种类	加入量	Oligo（dT）18(0.5 ug/uL)	1 uL	或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL														
RNA 模板种类	加入量																												
总 RNA	100-500 ng																												
或 poly(A) mRNA	10-500 ng																												
或专一的 RNA	0.01 pg-500 ng																												
引物种类	加入量																												
Oligo（dT）18(0.5 ug/uL)	1 uL																												
或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL																												

或 RNA 模板专一性引物	15-20 pmol
注意: 随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。	

- 加水到 13 uL 。
- 70℃保温 5 分钟后立即冰浴，此步可以打开 RNA 的二级结构。
- 再加入 5 uL RT Buffer（含 dNTP）。
- 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45℃保温 5 分钟。但如果使用随机引物，由于其很短，则改成 25℃ 5 分钟以便其跟 RNA 结合。
- 加入 1 uL MMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20 uL。
- 42℃保温 60 分钟。但如果使用随机引物，需要先 25℃保温 10 分钟，待合成了一段 cDNA 后，然后再转移到 42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。
- 70℃保温 10 分钟以终止反应，然后放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。

二：合成建文库用的 1st-strand cDNA

- 在一干净的反应管中加入 RNA 模板。注意：RNA 模板不能含有基因组 DNA 污染。

RNA 模板种类	加入量
poly(A) mRNA	1ug
或专一的 RNA	0.5-1 ug

- 加入引物

引物种类	加入量
Oligo (dT)18(0.5 ug/uL)	1 uL
或随机引物(0.2 ug/uL)	1 uL
或 RNA 模板专一性引物	100 pmol
注意: 随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。	

- 加水到 13uL。
- 70℃保温 5 分钟后立即冰浴，此步可以打开 RNA 的二级结构。
- 再加入 5 uL RT Buffer（含 dNTP）。
- 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45℃保温 5 分钟。如果使用随机引物，则改成 25℃ 5 分钟。

	7. 加入 2 uL MMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20uL。 8. 42℃保温 60 分钟，但如果使用随机引物，需要先 25℃保温 10 分钟，然后再转移到 42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。 9. 70℃保温 10 分钟以终止反应，放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以用于第二链 cDNA 的合成或放置在-20℃长期保存。
关联产品	两管式 RT-PCR 试剂盒