

## cDNA第一链合成试剂盒 目录号：AQ0101

Component	AQ0101A	AQ0101B
MMLV RTase 2.0	15 $\mu$ l	75 $\mu$ l
RNase Inhibitor	30 $\mu$ l	150 $\mu$ l
RNase H	30 $\mu$ l	150 $\mu$ l
5 $\times$ RT Buffer	200 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
10 mM dNTP	50 $\mu$ l	250 $\mu$ l
Nuclease-free Water	1ml	5ml

### 产品说明：

cDNA第一链合成试剂盒包括利用RNA模板制备第一链cDNA所需的酶、Buffer和dNTP。其中MMLV Reverse Transcriptase 2.0具有依赖于RNA模板的DNA聚合酶活性，缺失RNase H活性。依赖于RNA的DNA聚合酶活性能够以RNA为模板链，合成互补的DNA链(cDNA)。Reverse Transcriptase 2.0的热稳定性显著提高，**可以55-60°C反应**，在此温度范围内保留了50%以上的酶活性。本酶延伸能力更强，可以合成15-20kb的cDNA链。RNase inhibitor可以结合RNase A等RNA酶，抑制其对RNA分子的降解。RNase H可以切割DNA/RNA杂合链中的RNA链，生成cDNA单链。三个酶的联合作用，可以高效合成成长的cDNA链。试剂盒中提供DEPC处理的无核酸酶水，实验人员仅需准备无RNase A的离心管、枪头、特异性引物或polyT引物，即可进行cDNA第一链的制备。

### 特点：

- 合成 cDNA 的长度优于野生型 M-MLV 反转录酶；
- 热稳定性好：耐受55-65°C反应；
- 无 RNase H 活性。

### 适用范围

- 第一链 cDNA 合成
- 全长 cDNA 合成，制备 cDNA 文库；
- RT-PCR 以及 Real Time RT-PCR 反应中，第一链cDNA合成反应。

### 保存：

-20°C保存2年。

### 注意事项：

- 反转录温度设为50度适合绝大多数RNA，如RNA模板结构复杂，可将反转录温度提高到55度，以提高反转录效果。
- 建议在冰上配置 PCR 反应液后，再放入 PCR 仪中进行扩增。这有利于提高扩增的特异性，减少非特异性扩增，得到良好的 PCR 结果。
- 为了降低RNaseA 污染可能造成的 RNA 降解，导致 cDNA 合成失败，强烈建议每个反应加 1 $\mu$ l RNase Inhibitor。
- RNA 相关实验严格放置RNase A 污染，操作时需佩戴一次性口罩与手套，并及时更换。
- RNA 在碱性条件下不稳定，避免用高 pH 值溶液溶解 RNA。

## 应用举例：

若模板 RNA 是使用 RNA 提取试剂盒提取获得，已经清除了残留基因组 DNA，则可以直接进行以下步骤；否则请先去除 gDNA。

1. 将以下组分加入一个无核酸酶污染的 PCR 管中：

组份	体积/ $\mu$ l	终浓度
Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 $\mu$ M) 或 Random Primers (25 $\mu$ M) 或 Specific Primer (10 $\mu$ M)	1	5.0 $\mu$ M 2.5 $\mu$ M 1.0 $\mu$ M
Template*	1-5	100ng-1 $\mu$ g
Nuclease-free Water	Up to 10	/
总体积	10	/

\* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1  $\mu$ g；mRNA 的使用量一般为 0.1ng~1  $\mu$ g。

2. 将以上混合液在 65-70°C 下温育 5-10 分钟，迅速取出置于冰上冷却 2-3 分钟；
3. 继续配制如下反应混合液：

组份	体积/ $\mu$ l	终浓度
上述模板RNA/引物变性溶液	6	/
5 $\times$ RT Buffer (含 DTT)	6	1 $\times$
dNTPs (10.0 mM)	1.5	0.5 mM
MMLV Reverse Transcriptase 2.0 (200 U/ $\mu$ l)	0.5	
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) *	1	/
Nuclease-free Water	Up to 30	/
总体积	30	/

\*为了降低 RNaseA 污染可能导致的 RNA 降解，建议每个反应加1 $\mu$ l。

4. 手指轻柔敲弹混匀后，瞬时离心；
5. 若使用 Oligo(dT)<sub>20</sub> 或基因特异性引物，42-50°C 反应 30-60 分钟；若使用随机引物，首先 25°C 温育 10 分钟，之后 42-50°C 反应 30-60 分钟；
6. 反应结束后，80°C 保温 1-5 分钟失活 RTase，终止反应。然后加入1 $\mu$ l RNase H，在37度温育 15-30分钟，消化RNA/DNA杂合链，最终获得cDNA链。cDNA链冰上冷却，用于后续实验，或立即保存于-20°C。

得到的 cDNA 溶液可直接用于 2nd-Strand cDNA 的合成或者 PCR 扩增等，PCR 扩增时 cDNA溶液的使用量建议使用 1-5  $\mu$ l。