

Integrated First-strand cDNA Synthesis Kit

货号：DN2210-01
规格：100 次
保存：-20 °C

【产品简介】

本产品是一款高效、稳定、快速用于第一链 cDNA 合成的试剂盒， Integrated RT MasterMix 中含有新型耐高温反转录酶，对于含有二级结构和高 GC 的复杂模板，可以将逆转录温度提高至 60°C，克服 RNA 复 杂二级结构对 cDNA 合成的抑制，有效合成高质量 cDNA；StarScriptIII 反转录酶 cDNA 合成能力更高，非常适合少量模板 以及低拷贝基因的逆转录。以便合成高质量 cDNA。本试剂盒中包含由总 RNA 或 mRNA 合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分，并提供两种 cDNA 合成引物：RandomPrimer 和 Oligo18 (dT) 的预混液 Primer Mix，合成的 cDNA 产物可直接用来进行后续 PCR 或者 qPCR 反应。

【产品组分】

货号	组分	体积
DN200	Integrated RT MasterMix	100 µl
DN201	2XDiScript Buffer	1ml
DN202	Primer Mix（下游做 qPCR 选用）	100 µl
DN204	DEPC-dd H ₂ O	1.5 ml

【保存条件】

-20 °C恒温保存，保质期 24 个月。

【注意事项】

1. 反转录实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2. 提取过程中 RNA 样品保存在冰上以防止 RNA 降解。
3. RNA 模板在冰上解冻。所有试剂组分解冻并混匀，并短暂离心以收集至管底。解冻试剂置于冰上。
4. 逆转录反应产物可直接加入 PCR 反应液中进行扩增，但体积不应超过 PCR 反应体系的 10%，否则会影响扩增效果。
5. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板，合成含各种标记的 cDNA，作为杂交实验的探针。
6. RNA 可置于-70°C以下长期保存，cDNA 合成产物可置于-20°C保存。

【简化操作流程】

注：此简化流程适用于 qPCR 实验中的反转录步骤。

1. 在 DNase&RNase-free 离心管中加入下列成分：

组分	体积
RNA 模板	≤1 µg total RNA 或≤0.1 µg poly(A) mRNA
Primer Mix	1 µl [*]
2XDiScript Buffer	10 µl
Integrated RT MasterMix	1 µl
DEPC-dd H ₂ O	补足至 20 µl

^{*} 根据不同的实验目的，引物可选择加入试剂盒自带的 Primer Mix，或是加入自备的 1 µl Oligo18 (dT)或1 µl Random Primer。也可以根据实验需要，加入1 µl 自备的序列特异性引物（浓度 20µM）。采用自备的序列特异性引物时，RNA 模板的量可调整为“≤5 µg total RNA 或≤ 0.5 µg poly(A) mRNA ”。

2. 轻轻混匀，短暂离心；50℃孵育 15 min。
注：复杂模板逆转录温度建议提高至 55-60℃。反应时间可根据实验应用场景做适当调整。
3. 85℃加热 5 min 失活 Integrated RT MasterMix。
4. 反应结束后所得的 cDNA，请置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

【标准操作流程】

- 注：按此步骤操作有助于打开复杂 RNA 模板的二级结构，提高反转录效率，增加 cDNA 产物的长度。*
1. 按照下表配制反应体系

组分	体积
RNA 模板	≤1 μg total RNA 或≤0.1 μg poly(A) mRNA)
Primer Mix	1 μl [*]
DEPC-dd H ₂ O	补足至 9 μl

- * 根据不同的实验目的，引物可选择加入试剂盒自带的 Primer Mix，或是加入自备的 1 μl Oligo18 (dT) 或 1 μl Random Primer。也可以根据实验需要，加入 1 μl 自备的序列特异性引物（浓度 20 μM）。采用自备的序列特异性引物时，RNA 模板的量可调整为“≤ 5 μg total RNA 或 ≤ 0.5 μg poly(A) mRNA ”。*
2. 65℃孵育 5 min，再立即冰浴 2 min。
注：此步骤操作有助于打开复杂 RNA 模板的二级结构，提高反转录效率，增加 cDNA 产物的长度。
3. 在上述反应管中加入反转录反应液，总体积为 20 μl。

组分	体积
步骤 2 处理后的反应液	9 μl
2XDiScript Buffer	10 μl
Integrated RT MasterMix	1 μl
总反应体系	20 μl

4. 轻轻混匀，短暂离心，25℃孵育 10 min，50℃孵育 30-50 min。
*注：复杂模板逆转录温度可升高至 55-60℃，提高反转录效率。
反应时间可根据实验应用场景做适当调整。如合成的 cDNA 用作 qPCR 模板，则反应条件为 50℃孵育 15 min，见【简化操作流程】。*
5. 85℃加热 5 min 失活 Integrated RT MasterMix。
6. 反应结束后所得的 cDNA，请置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。