天净沙系列

CAT#:230367

低温运输，-20℃保存

天净沙

# cDNA 第二链合成试剂盒

## Second Strand cDNA Synthesis Kit

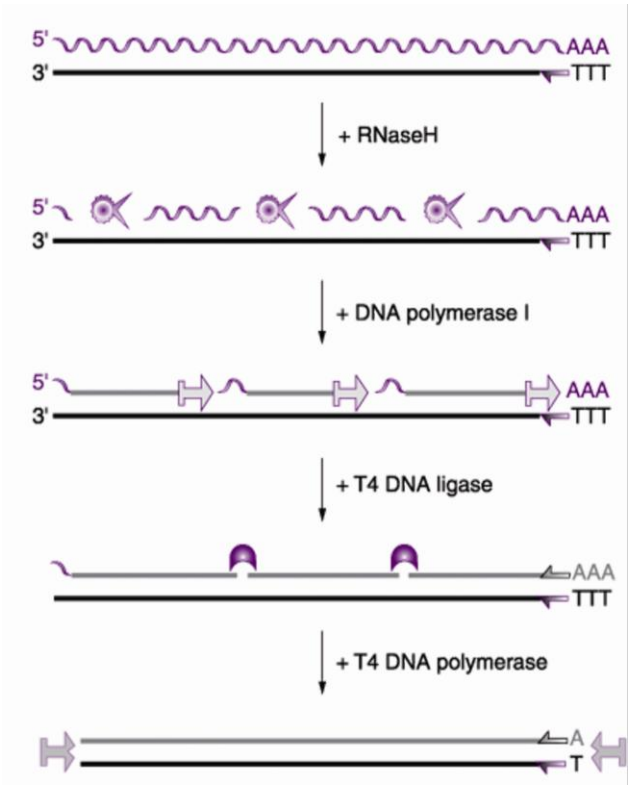
## 使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

cDNA 第二链合成试剂盒的起始材料是已经完成第一链 cDNA 合成的 RNA-DNA 杂交链。其原理是用 RNase H 使 RNA-DNA 杂合链中的 RNA 产生切口，再用 DNA Polymerase I 通过切口平移(nick translation)反应进行 RNA 链取代合成 cDNA 第二链，其示意图如下:




本产品具有下列特点:

1. 即开即用，含有合成 cDNA 第二链的所有试剂，包括 RNase H、E.coli DNA 聚合酶 1 和 DNA 连接酶。
2. 一管式操作，不需要每次进行纯化，不丢失宝贵的样品。
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 80 μL 体系的 cDNA 第二链合成反应。

## 规格及成分

本产品采用五孔盒包装

| 名称 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 5×cDNA 第二链合成缓冲液 | 220627a | 160 μL | 0.5 mL 白盖管 |
| 20×cDNA 第二链合成酶混合液 | 220627b | 40 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 0.2 M EDTA 溶液 | 230367c | 60 μL | 0.5 mL 本色管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL 蓝盖管 |
| 使用手册 | 230367sc | 1 份 | 无 |

| | |
|---|---|
| **运输及保存** | 低温运输，-20℃保存，有效期一年。 |
| **自备试剂** | cDNA 第一链合成试剂等 |
| **使用方法** | **一、合成 cDNA 第一条链**<br>本试剂盒不提供 cDNA 第一链合成试剂，用户需自备相关试剂合成 cDNA 第一链。<br>**二、合成 cDNA 第二链**<br>1. 在冰浴上向 10 μL 已经完成 cDNA 第一条链合成的反应体系（逆转录体系）中依次加入下表试剂，如果多于 10 μL，请只取用 10 μL: |

| 成分 | 用量 |
|---|---|
| 超纯水 | 48 μL |
| cDNA 第二链合成缓冲液 | 16 μL |
| cDNA 第二链合成酶混合液 | 4 μL |
| 共 80 μL，轻柔吹打混匀后，短暂离心，16℃保温 2 小时 | |
| 自备的 T4 DNA 聚合酶（见注） | 1 μL |
| 轻柔吹打混匀后，16℃继续保温 30 分钟 | |
| 0.2 M EDTA 溶液 | 2 μL |

注：克隆双链 cDNA 一般需要平末端化，需要 T4 DNA 聚合酶处理步骤。PCR、SSH 等后续处理一般不需要把双链 cDNA 平末端化，则可以跳过 T4 DNA 聚合酶处理步骤，直接用 EDTA 终止反应。

2. 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 μL 0.2 M EDTA 溶液终止反应，然后将样品放-20℃长期保存。如果后续实验（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。
3. 电泳 5 μL 检测 cDNA 质量。如果 cDNA 在 0.5-10 Kb 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。
4. 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（SSH）等实验。

| | |
|---|---|
| **关联产品** | 一管式双链 cDNA 合成试剂盒（起始材料为 RNA） |