天净沙系列

CAT#:960906

低温运输,-20℃保存

天净沙

逆转录试剂盒

Reverse Transcription Kit

使用手册 V1.1

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

本试剂盒提供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。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的逆转录反应。
7. 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
MMLV（含 RI）	960906a	50 μL	0.5 mL 红盖管
4×RT Buffer（含 dNTP）	960906b	250 μL	0.5 mL 绿盖管
Oligo (dT)12-18 引物干粉	220629	25 μg	0.5 mL 白盖管
随机引物(6 碱基，无修饰)干粉	220574	10 μg	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	960906sc	1 份	无

注意：首次使用本产品时，需要在 Oligo (dT)12-18 引物干粉管中加入 50 μL 超纯水，涡旋震荡半分钟混匀，得到 0.5 μg/μL 的 Oligo (dT)12-18 引物溶液；需要在随机引物 (6 碱基，无修饰) 干粉管中加入 50 μL 超纯水，涡旋震荡半分钟混匀，得到 0.2 μg/μL 的随机引物溶液。没有用完的引物需要放置在-20℃保存。

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。

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

2. 加入引物和水

引物种类	加入量

Oligo (dT)12-18，0.5 μg/μL	1 μL
或随机引物(6 碱基，无修饰)，0.2 μg/μL	1 μL
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。	

3. 加水到 14 μL 。
4. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴，此步可以打开 RNA 的二级结构。
5. 再加入 5 μL 4×RT Buffer（含 dNTP）。
6. 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。
7. 加入 1 μL MMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20 μL。
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，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。
9. 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

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。

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

2. 加入引物

引物种类	加入量
Oligo (dT)12-18，0.5 mg/mL	1 mL
或随机引物(6 碱基，无修饰) 0.2 mg/mL	1 mL
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。	

3. 加水到 13 μL。
4. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴，此步可以打开 RNA 的二级结构。
5. 再加入 5 μL 4×RT Buffer（含 dNTP）。
6. 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 μL MMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20 μL。

	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