

Fast First-Strand cDNA Synthesis Mix for RT (with dsDNase)

产品货号：500-101

产品简介

本产品包含具有高温耐受性的逆转录酶及其反应所需的 Buffer、RNase 抑制剂、dNTPs、Oligo(dT)₂₀VN、随机引物等主要成分，为 5×即用型预混 Mix，使用时只需加入 dsDNase 及其反应所需的 Buffer、RNA 模板、水，使其工作浓度为 1×即可进行逆转录，得到的 cDNA 主要用于下游的 qPCR 实验。

本产品的逆转录酶是通过基因工程的方法将 M-MLV 基因进行特定功能改造，并通过大肠杆菌的重组表达而获得，该酶去除了 RNase H 活性，具有更高的温度耐受性，可进行高温逆转录，降低 RNA 的高级结构与非特异性因素对 cDNA 合成的不利影响。

产品组成

组分	规格 (100T)	货号
Fast First-Strand cDNA Synthesis Mix	400 μL	500-101A
dsDNase	1×100 μL	500-101B
10×dsDNase Buffer	200 μL	500-101C
Nuclease-Free Water	2×1mL	500-101D

储存条件

2~8℃保存，3个月有效；-20℃保存，两年有效。使用时尽可能避免反复冻融。冰袋运输。

使用方法

一步法 (适用于基因组 DNA 含量低的 RNA 样品)

于冰上配制如下反应液：

试剂	使用量
Fast First-Strand cDNA Synthesis Mix	4 μL
dsDNase	1 μL
RNA 模板	50 ng~1 μg
Nuclease-Free Water	补至 20 μL

注：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板，信天翁生物的 RNA 提取试剂盒可适用。

瞬时离心，吹打混匀后按照如下程序进行反应：

温度	时间	用途
37℃	2 min	去除基因组 DNA
55℃	15 min	逆转录
85℃	5 min	终止逆转录

将得到的 cDNA 置于冰上，用于后续的实验。可在-20℃中短期保存，建议不超过 1 周。长期保存请分装后放置-80℃冰箱。

两步法 (适用于基因组 DNA 含量高的 RNA 样品)

1. 去除基因组 DNA

于冰上配制如下反应液：

试剂	使用量
dsDNase	1 μ L
10 $\times$ dsDNase Buffer	1 μ L
RNA 模板	50 ng~1 μ g
Nuclease-Free Water	补至 10 μ L

注：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板，信天翁生物的 RNA 提取试剂盒可适用。

瞬时离心，吹打混匀后按照如下程序进行反应：

温度	时间	用途
37 $^{\circ}$ C	2 min	去除基因组 DNA
65 $^{\circ}$ C	2 min	失活 dsDNase，终止反应

注：若 RNA 模板中基因组 DNA 的含量较多，可适当延长 37 $^{\circ}$ C 的孵育时间至 5 min。

2. 第一链 cDNA 合成

于冰上配制如下反应液：

试剂	使用量
“第 1 步”的反应产物	10 μ L
Fast First-Strand cDNA Synthesis Mix	4 μ L
Nuclease-Free Water	补至 20 μ L

注：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板，信天翁生物的 RNA 提取试剂盒可适用。

瞬时离心，吹打混匀后按照如下程序进行反应：

温度	时间	用途
50 $^{\circ}$ C	15 min	逆转录
85 $^{\circ}$ C	5 min	终止逆转录

注：若目标 RNA 不含有 Poly(A)结构，可预先进行 25 $^{\circ}$ C 温育 10 min，然后再按照该程序进行反应。

将得到的 cDNA 置于冰上，用于后续的实验。可在 -20 $^{\circ}$ C 中短期保存，建议不超过 1 周。长期保存请分装后放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

注意事项

1. 包含 Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物，不仅适用于含有 Poly(A)结构的真核生物 mRNA，也适用于不含有 Poly(A)结构的原核生物 RNA、真核生物 rRNA 和 tRNA 等模板，但不适用于 miRNA 等小 RNA 模板。
2. 待 Mix 完全解冻融化后方可使用，且使用过程前需上下颠倒混匀，不能涡旋或振荡混匀，避免产生过多的气泡。
3. RNA 的纯度和完整性都会影响 cDNA 的产量和下游的 qPCR 实验结果，因此，尽可能使用试剂盒来提取 RNA。