

版本号: KR121221

TIANScript RT Kit

TIANScript cDNA第一链合成试剂盒

目录号: KR104

产品内容

产品组成	KR104-01 25 rxn	KR104-02 100 rxn
TIANScript M-MLV (200 U/μl)	25 μl	100 μl
Oligo (dT) ₁₅ (10 μM)	60 μl	240 μl
Random (10 μM)	60 μl	240 μl
5×First-Strand Buffer	150 μl	500 μl
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2×1 ml
Super Pure dNTPs(2.5 mM each)	60 μl	240 μl
RNasin(40 U/μl)	15 μl	2×30 μl

储存条件

-20°C 保存。

产品简介

TIANScript RT Kit (cDNA第一链合成试剂盒) 是专为两步法RT-PCR第一步实验配制的, 具有高灵敏度的RT-PCR反应系统, 可以从极低量的总RNA或poly(A)⁺ RNA合成第一链cDNA。与PCR反应相结合, 可用于检测稀有基因的表达、从极少量细胞中定量检测特定mRNA的表达水平、克隆特定基因的cDNA片段等。

产品特点

合理配备了与cDNA第一链合成反应相关的各种组分, 该试剂盒中的TIANScript M-MLV具有高效的逆转录酶活性, 对后续的PCR或定量PCR实验兼容性好, 适合于各种PCR耐热聚合酶。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 用于cDNA合成反应的溶液试剂尽可能用DEPC进行处理, 并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时, 首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后, 再将溶液进行过滤除菌处理。
 2. RNA样品要避免基因组DNA污染。
 3. 避免多次反复冻融RNA, 使RNA保持在冰浴中处融化状态。
 4. 试剂盒的各组成成分应在-20°C保存。
 5. cDNA产物应置于-20°C保存。
-

操作步骤

1. 在冰浴的无核酸酶的离心管中加入如下反应混合物：
 - 1-5 μg 总RNA或50-500 ng mRNA;
 - 2 μl oligo (dT)₁₅或2 μl Random或2 pmol 基因特异引物;
 - 2 μl Super Pure dNTPs(2.5 mM each);
 - 补RNase-Free ddH₂O定容至14.5 μl 。
 2. 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min后迅速在冰上冷却2 min。简短离心收集反应液后加入以下各组分：
 - 4 μl 5 \times First-Strand Buffer (含有DTT) ; 0.5 μl RNasin。
 3. 加1 μl (200 U) TIANScript M-MLV, 轻轻用移液器混匀。如果用随机引物, 请将离心管置25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴10 min。
 4. 42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴50 min。
 5. 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min终止反应, 置冰上进行后续实验或冷冻保存。
 - 如果需要用RNase H处理, 进行步骤6。否则, 进行步骤7。
 6. 加RNase H 1 μl (2 U), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴20 min以降解RNA。然后95 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min使酶失活。
 7. 用RNase-Free ddH₂O将反应体系稀释到50 μl , 取2-5 μl 进行PCR扩增反应。
-

PCR反应

应吸取10%的第一链反应液（2 μl ）进行PCR反应；即使加入更多量的第一链反应液也不能增加其扩增的产物量，反而可能会抑制正常的PCR反应。

1. 请将以下成分加入到一PCR管中并使其终反应体积为50 μl ：

组成成分	体积
10 \times PCR Buffer	5 μl
Taq DNA polymerase (5 U/ μl)	0.4 μl
10 mM dNTPs mix	1 μl
50 mM MgCl_2	1.5 μl
扩增引物1 (10 μM)	1 μl
扩增引物2 (10 μM)	1 μl
cDNA (第一链反应)	2 μl
ddH ₂ O	38.1 μl
总体积	50 μl

注：为了得到最好结果， MgCl_2 最适浓度应依不同的模板-引物对而定。

2. 94 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性2 min。
 3. 设置15到40个PCR循环。退火与延伸条件依引物和模板而定。
-