Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

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_2O	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℃保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

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℃保存。
5. cDNA产物应置于-20℃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 ddH_2O定容至14.5 μl。

2. 70℃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×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℃温浴10 min。

4. 42℃温浴50 min。

5. 95℃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℃温浴20 min以降解RNA。然后95℃加热5 min使酶失活。

7. 用RNase-Free ddH_2O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×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_2O	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℃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。