

NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix

目录号: E043

产品描述:

第一链cDNA合成预混液是以mRNA或者总RNA为模板，高效合成第一链cDNA。本产品含有反转录反应所需的全部试剂（NovoScript® Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Oligo(dT)₁₈, Random N6, dNTPs），浓度为2×。反应时只需要加入RNA模板和水即可，操作简单，减少操作过程中的污染。合成的第一链cDNA可直接用于PCR或荧光定量PCR的模板，第二链cDNA的合成或线性RNA扩增，也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验。

产品特点:

- 本制品中使用的 NovoScript Reverse Transcriptase 无 RNase H 活性，可避免第一链 cDNA 合成过程中，RNA/DNA 杂交模板链中 RNA 降解，保证了 cDNA 合成质量。
- 本制品中 Random N6 和 Oligo(dT)₁₈ 引物比例经过优化，可均匀合成样品中的 cDNA。
- 操作简单，只需要加入 RNA 模板和水即可完成反应体系配制，降低了操作过程中的污染机会。

保存温度: -20℃。

产品包装 (A 包装):

产品组成	体积
2×NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	500μl
RNase Free Water	1ml

注意事项:

- 1) 用 DEPC 处理实验用到的所有实验器材，或购买已经证明无核酸酶的实验用具，实验过程戴手套并经常更换手套，避免 RNA 酶的污染。
- 2) 确保所用试剂中无 RNA 酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中，所有管子确保扣严。
- 4) 纯化过的 RNA 必须保证不含有盐，金属离子，乙醇和苯酚，以上成分会干扰第一链 cDNA 合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除掉痕量污染物。
- 5) 为保证反转录反应有效进行，需使用高质量的 RNA 模板。
- 6) 有实验结果提示，本反转录酶可在 15 分钟内完成 1kb 反转录反应。

操作方法:

I. 第一链 cDNA 合成

试剂融化后，可将试剂盒中各组分稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物:

模板 RNA	总 RNA(0.1 ng -5μg)
	poly(A) mRNA(10pg)
	特异性 RNA(0.01 pg)
2×NovoScript® 1st Strand Synthesis Supermix	10μl
RNase Free Water	至 20μl

可选步骤: 如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构, 可先将 RNA 模板和 RNase Free Water 混匀后, 65°C 孵育 5 分钟 (有助于打开高级结构, 便于下一步反应的进行), 迅速置于冰上冷却, 再加入其它组分。

2) 轻轻混匀, 离心。

3) 42°C 孵育 15-30 分钟 (如果 RNA 模板中不含 poly A 结构, 25°C 先孵育 5 分钟, 随后 42°C 孵育 15-30 分钟)。

4) 产物可直接用于下一步反应。如果不立即使用, 可于-20°C 保存一周, 长时间保存建议-70°C 放置。

II. 第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

常用反应体系 (50μl):

2×Taq Master Mix*	25μl
上游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
模板	1-2μl
ddH ₂ O	至 50μl

*Mg²⁺终浓度为 2mM

常用 PCR 循环:

94°C,	1 分钟 30 秒
30 次循环:	94°C, 20 秒 57°C, 20 秒 72°C, 1kb/60 秒
72°C	5 分钟
4°C	保温