

UnionScript First-strand cDNA Synthesis Kit (with dsDNase)

目录号

GRS50140

产品组成

组分	规格 (50 次)
M-MLV III Reverse Transcriptase(200 U/ μ L)	50 μ L
5 \times M-MLV III Buffer*	200 μ L
dsDNase	50 μ L
10 \times dsDNase Buffer	50 μ L
DTT	50 μ L
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	50 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	50 μ L
Random Primer (50 μ M)	50 μ L
Nuclease-Free Water	1.0 mL

*包含 dNTP Mix。

保存条件

-20°C保存 12 个月。

产品简介

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步 cDNA 第一链合成配制的试剂盒，它包含从 RNA 模板到 cDNA 合成所需的所有试剂。本产品中包含的 M-MLV III Reverse Transcriptase 是新一代逆转录酶，该酶去除了 RNase H 活性，并大幅提高了热稳定性和逆转录效率，将最适反应温度提高为 50°C，从而极大地提高了合成 cDNA 第一链时的特异性和长度（最长可达 12 kb），以及增强了对 RNA 复杂二级结构的耐受性。

产品特点

- 热稳定性强：50°C反应，提高了 RNA 模板复杂二级结构的逆转录效率；
- 逆转录效率高：与市面上同类产品对比，本产品的逆转录效率更高；
- 快速去除基因组污染。

适用范围

本产品适用于动物、植物及微生物 RNA 模板（总 RNA 或 mRNA）的第一链 cDNA 合成反应，后续可用于 PCR、qPCR、cDNA 第二链的合成以及 cDNA 文库构建等实验。

注意事项

1. 若后续实验为 PCR，模版 RNA 为真核生物 mRNA，一般情况下首选 Oligo dT Primer，与真核生物 mRNA 的 3' PolyA 尾配对，可获得最高产量的全长 cDNA；基因特异性引物的特异性最高，若基因特异性引物逆转录效率较差时也可使用 Oligo dT Primer；当目标区域具有复杂二级结构或 GC 含量较高，或者模板为原核生物 RNA，推荐使用 Random Primer 进行逆转录。
2. 根据实验需求确定是否需要进行基因组去除步骤，若不进行基因组去除步骤，可直接进行逆转录反应，空余体积用 Nuclease-Free Water 补足即可。
3. 建议将逆转录得到的 cDNA 原液稀释 5~10 倍后再作为 qPCR 反应的模板，若直接使用 cDNA 原液作为模板，建议 cDNA 原液体积不超过 qPCR 反应体积的 1/10；
4. 逆转录产物建议立即用于 qPCR 反应或保存于 -20°C 后尽快使用。若需要长期保存，建议于 -80°C 保存，避免反复冻融。

使用方法

● 后续实验为 PCR

一、RNA 模板变性（≥3kb cDNA 合成需进行此步骤，可使模板 RNA 变性，提高逆转录效率）

1. 在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液（冰上配制）：

组分	使用量
RNA 模板*	50 ng~1 μg
Oligo dT Primer (50 μM) or Random Primer (50 μM) or Gene Specific Primer(2 μM)	1.0 μL
Nuclease-Free Water	Up to 8 μL

*模板：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后 65°C 孵育 5min，冰上迅速冷却。

二、基因组 DNA 去除

1. 在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液（冰上配制）：

组分	使用量
上述反应液	8 μL
dsDNase	1.0 μL
10 \times dsDNase Buffer	1.0 μL

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min，冰上迅速冷却。

三、逆转录反应

1. 在上述反应管中加入以下试剂：

组分	使用量
上述反应液	10 μL
M-MLV III Reverse Transcriptase(200 U/ μL)	1.0 μL
5 \times M-MLV III Buffer	4.0 μL
DTT	1.0 μL
RNase Inhibitor (40 U/ μL)	1.0 μL
Nuclease-Free Water	Up to 20 μL

*推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应（反应结束后立即置于冰上）：

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$ （可选*）	10 min
50 $^{\circ}\text{C}$	30~60 min
85 $^{\circ}\text{C}$	5 min

*若逆转录引物用 Random Primer 时需要进行此步骤，其他引物可省略此步骤。

● 后续实验为 qPCR

一、基因组 DNA 去除

1. 在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液（冰上配制）：

组分	使用量
RNA 模板*	50 ng~1 μg
dsDNase	1.0 μL
10 \times dsDNase Buffer	1.0 μL
Nuclease-Free Water	Up to 10 μL

*模板：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min，冰上迅速冷却。

二、逆转录反应

1. 在上述反应管中加入以下试剂：

组分	使用量
上述反应液	10 μ L
M-MLV III Reverse Transcriptase(200 U/ μ L)	1.0 μ L
5 \times M-MLV III Buffer	4.0 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ L
Random Primer (50 μ M)	0.5 μ L
DTT	1.0 μ L
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	1.0 μ L
Nuclease-Free Water	Up to 20 μ L

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应（反应结束后立即置于冰上）：

温度	时间
50°C	15 min
85°C	5 min

常见问题与解决办法

Q1：逆转录后的cDNA产物进行qPCR检测，CT值偏高？

A1：

- 1) 模板 RNA 提取失败或存在降解。建议在逆转录反应前一定要电泳验证 RNA 的完整性，提取 RNA 后尽快进行逆转录及 qPCR 操作；
- 2) 基因表达量较低。可适当提高模板 RNA 用量；
- 3) 逆转录体系、程序或加样等操作不当。建议按照说明书规范操作。

Q2：反转录产物 PCR 扩增无条带？

A2：

- 1) 模板 RNA 提取失败或存在降解。建议在逆转录反应前一定要对模板 RNA 进行电泳和 OD 值分析，RNA 不要保存时间过长，尽快进行逆转录及 PCR 操作。
- 2) 逆转录引物选择不当。含 poly(A)的 RNA 逆转录引物使用 oligo dT。
- 3) 逆转录体系、程序及加样等操作不当，建议按照说明书规范操作。
- 4) PCR 模板 cDNA 浓度过高抑制 PCR 扩增，逆转录后以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，建议将模板稀释 5-10 倍。
- 5) 引物设计不合适。建议初次实验设计 2-3 对引物一起尝试。
- 6) PCR 程序不合适。建议尝试退火温度梯度或者 Touchdown PCR 程序。
- 7) DNA 聚合酶不合适或扩增效率低。建议多尝试几种 DNA 聚合酶。
- 8) RNA 模板具有复杂二级结构。建议增加 RNA 变性步骤。