

Orisience First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA 第一链合成试剂盒)

产品信息

货号	名称	规格
NF101-50T	Orisience First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA 第一链合成试剂盒)	50T
NF101-100T	Orisience First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA 第一链合成试剂盒)	100T

产品简介

Orisience First Strand cDNA Synthesis Kit cDNA 第一链合成试剂盒，用于从 mRNA 或总 RNA 模板中高效合成 cDNA 第一链。该试剂盒使用经基因改造的 Oriscript 逆转录酶，与 AMV 逆转录酶相比，其 RNase H 活性较低。该酶在 42-50 °C 下保持活性，适用于长达 13 kb 的 cDNA 链合成。

本试剂盒提供两种 cDNA 合成引物：Random Primer 和 Oligo (dT)18 Primer，用户可根据需要，灵活选择逆转录引物进行后续实验，使用本试剂盒合成的 cDNA，可以直接用于后续的常规 PCR、qPCR、cDNA 的第二链合成以及 cDNA 文库的构建等。

产品组成

名称	Orisience First Strand cDNA Synthesis Kit		
产品组分	NF101-50T	NF101-100T	储存条件
Oriscript 逆转录酶 (200 U/μL)	60 μL	120 μL	-20°C
RNase Inhibitor (20 U/μL)	60 μL	120 μL	-20°C
5× Reaction Buffer	250 μL	500 μL	-20°C
10 mM dNTP Mix	125 μL	250 μL	-20°C
Oligo(dT)18 Primer, 100 μM	60 μL	120 μL	-20°C
Random Primer, 100 μM	60 μL	120 μL	-20°C
Control GAPDH RNA	10 μL	20 μL	-20°C
Forward GAPDH Primer	10 μL	20 μL	-20°C
Reverse GAPDH Primer	10 μL	20 μL	-20°C
Water, nuclease-free	1.25 mL	2*1.25 mL	-20°C

使用说明

1. 引物选择：

- Oligo(dT)18 Primer 可以结合 mRNA 的 3'端的 polyA，因此常用于反转录含有 polyA 的 RNA。Oligo(dT)18 Primer 常用于构建真核生物的 cDNA 文库、目标基因的分子克隆、cDNA 的 3'RACE 扩增法等实验。
- Random Primer 可以用于 rRNA、tRNA、小 RNA、非编码 RNA、降解 RNA、原核生物 RNA、某些病毒 RNA 等不带 polyA 尾的 RNA。
- 将 Oligo(dT)18 Primer 与 Random Primer 以指导比例混合使用，可使 mRNA 的各个区域 cDNA 合成效率相同，有助于提高定量结果的真实性重复性。

2. 反转录反应

cDNA 第一链合成(First-stand cDNA Synthesis)将试剂盒从-20°C拿出后，冰上解冻。

a. 参考如下表格设置反转录反应：

模板 RNA (右侧 RNA 任选一种)	total RNA	0.1 ng - 5 μg
	poly(A) mRNA	10 pg - 0.5 μg
	specific RNA	0.01 pg - 0.5 μg
引物 (右侧引物任选一种)	Oligo (dT)18 primer	1 μL

	Random primer	1 μ L
	gene-specific primer	15-20 pmol
Water, nuclease-free	—	Up to 12 μ L
5x Reaction Buffer	—	4 μ L
RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	—	1 μ L
10 mM dNTP Mix	—	2 μ L
Oriscript 逆转录酶 (200 U/ μ L)	—	1 μ L
总体积	20 μ L	

b. 如果使用 Oligo(dT)18 或基因特异性引物，42°C 孵育 60 min。

c. 如果使用试剂盒中的随机引物 (random primer) 作为引物，先在 25°C 孵育 10 min，随后在 42°C 孵育 60 min。

OriNote: 对于 GC 含量较高或二级结构比较严重的模板 RNA，可以 50°C 孵育 60 min，本产品中的反转录酶在 50°C 时仍有良好活性，在较高温度进行反转录可以有效减少二级结构的干扰。

d. 70°C 孵育 5 min 终止反转录反应。

OriNote: 逆转录反应产物可直接用于 PCR 或在 -20 °C 下储存一周。如需更长时间的储存，建议使用 -70 °C。

常见问题

Q1: 低产量或无 RT-PCR 产物

a. 模板 RNA 降解: RNA 纯度和完整性对于合成全长 cDNA 至关重要，在 cDNA 合成之前，请务必评估 RNA 的完整性。

b. 模板纯度低: RNA 提取过程中某些试剂残留会影响 cDNA 的合成如: SDS、EDTA、胍盐、磷酸盐、焦磷酸盐、多胺、亚精胺。要去除痕量污染物，请用乙醇重新沉淀 RNA 并用 75 % 乙醇洗涤沉淀；

c. 模板数量不足: 将模板量增加到建议的水平，在抽提获得总 RNA 后，在进行一些精细的定量检测时通常会进行 DNase I 消化，以充分去除可能的残留的 DNA 的干扰。DNase I 进行热失活时，需要加入 EDTA 至终浓度为 2.5mM，否则 RNA 在没有螯合剂的情况下，在加热过程中容易被水解，从而导致模板量不足。此外，扩增特定基因时，需要先查询该基因的组织分布特点，利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和 PCR 扩增，通常会由于模板量过少而 PCR 扩增失败。

d. 选择正确的引物: 对于细菌 RNA 和不含 poly(A)尾巴的 RNA，要用试剂盒中的 random primer 引物代替 Oligo(dT)18 引物。使用基因特异性反转录引物时，需要确保基因特异性引物设计合理正确。

e. 模板富含 GC: 如果 RNA 模板富含 GC 或容易形成二级结构，请提高逆转录反应的温度，最高为 45 °C。

Oriscience Biotechnology Co., Ltd.

www.oriscience.com

Tel: 400-158-2128

Emails: order@oriscience.com

technical_support@oriscience.com

