**SiDoTek™ First Strand cDNA Synthesis Kit (with dsDNase)**

**第一链反转录试剂盒（含双链特异性DNA酶）**

**目录号：SDMR2-2a**

**储存条件：-30 ~ -15℃保存2年，≤0℃运输**

**产品内容：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **规格**  **SDMR2-2a** | **规格**  **SDMR2-3a** |
| 5× gDNA Eraser Mix  5× RT Buffer  10×Enzyme Mix  Oligo(dT)23VN Primer (50μM)  Random Primers N6 (50μM)  RNase-free Water | 100 μL  200 μL  100 μL  50 μL  50 μL  1 mL | 2×100 μL  400 μL  200 μL  100 μL  100 μL  2×1 mL |

**产品简介**

SiDoTek™ First Strand cDNA Synthesis Kit (with dsDNase)是一款含有基因组去除组分的第一链cDNA合成试剂盒，可高效去除RNA中的基因组DNA污染。试剂盒中包含合成高质量第一链 cDNA所需的所有成分，产物可作为模板适用于后续的PCR、qPCR等实验。5×RT Buffer 中包含优化的缓冲体系和dNTP；10×Enzyme Mix中包含 Heat-stable Reverse Transcriptase和RNase inhibitor。本试剂盒采用的Oligo (dT)23 VN比传统的Oligo (dT)18对于Poly A+ mRNA的锚定能力更强，使得逆转录效率更高。用户可根据实验的具体需要，自行选择Oligo (dT)23 VN、Random Primers N6或基因特异引物作为逆转录引物。当模板是带Poly A尾的真核生物mRNA和一些带Poly A尾的病毒RNA，反转录引物可以选择Oligo(dT)18(0.5 μg /μl)。原核生物或者不带Poly A尾的病毒mRNA无法使用Oligo dT 作为引物，因此反转录引物只能选择Random Primer N6(0.1 μg/μl)。

**适用范围**

用于第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。也可用于cDNA片段长度12 kb 以内的合成。

**注意事项**

1. 操作过程严格避免RNase污染。为保证反转录成功，建议使用高质量的RNA样品。

2. 为避免样品间交叉污染和气溶胶污染，推荐在超净台或生物安全柜中进行反应体系的配制,并使用带滤芯的吸头。

3. **注意：**5× gDNA Eraser Mix 、5× RT MasterMix非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请离心后再使用，并且避免试剂在吸头外壁沾附而造成大量损失。

4.请于使用前确保产品完全解冻，彻底混匀后短暂离心，置于冰上备用。反复冻融会影响产品的性能。

5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**实验流程 （以20 μL反应体系为例）**

**推荐的基因组DNA去除体系**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **10 μL体系添加体积** |
| 5× gDNA Eraser Mix | 2 μL |
| Total RNA | ＜1 μg |
| RNase-free Water | up to 10 μL |

用移液器轻轻吹打混匀，37℃反应2min，立即置于冰上，或者继续55℃反应5min后置于冰上。（55℃反应5min能充分失活dsDNase，后续加入的5× RT Buffer中含有DTT也能抑制dsDNase的活性）

**配制第一链cDNA合成反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **20 μL体系添加体积** |
| 上一步混合液 | 10 μL |
| Oligo(dT)23VN Primer (50μM)  or/and Random Primers N6 (50μM)\*  or Gene Specific Primers (2μM) | 1 μL |
| 5× RT Buffer  10× Enzyme Mix | 4 μL  2 μL |
| RNase-free Water | up to 20 μL |

使用移液器轻轻吹打混匀。

**\*Oligo d(T)23 VN 与 Random Primers N6 同时使用效果更好**

**如用Oligo(dT)23 VN 或基因特异引物(GSP)时，**

**按下列反应条件进行第一链cDNA合成**

|  |  |
| --- | --- |
| **温度** | **孵育时间** |
| 42℃**\***  85℃ | 30 ~ 50 min（如产物用于qPCR时，15~20 min）  5 min |

**\*如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高到55℃，有助于提高产量。**

**如用Random Primers N6 时，按下列反应条件进行第一链cDNA合成**

|  |  |
| --- | --- |
| **温度** | **孵育时间** |
| 25℃  42℃**\***  85℃ | 5 ~ 10 min  30 ~ 50 min（如产物用于qPCR时，15~20 min）  5 min |

**\*如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高到55℃，有助于提高产量。**

得到的cDNA产物可立即用于PCR或qPCR反应，或在-20℃保存，并在半年内使用，长期存放建议分装后在-80℃保存。做qPCR时，建议取1/10 ~ 1/5 体积(即2 ~ 4 μl)的反转录产物作为PCR模板。丰度高的可以酌情适当稀释cDNA后使用。cDNA应避免反复冻融。