

Rayscript cDNA Synthesis Kit User Manual

cDNA 合成（逆转录）试剂盒使用说明书

I. 产品组成

产品组成	GK8030-20 25ul X 20 reactions	GK8030-50 25ul X 50 reactions	GK8030-100 25ul X 100 reactions
200 U/μl M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H-)	1X20 ul	1X50 ul	2X50 ul
5 x RT Reaction Buffer	1X100 ul	1X250 ul	2X250 ul
25 U/μl RNase Inhibitor	1X20 ul	1X50 ul	2X50 ul
25 mM dNTP	1X20 ul	1X50 ul	2X50 ul
60 μM Oligo (dT) ₁₈	1X20 ul	1X50 ul	2X50 ul
250 μM Random Primer	1X20 ul	1X50 ul	2X50 ul
dd H ₂ O (RNase and DNase free)	1X1 ml	1X1 ml	1X1 ml

II. 储存条件

收到试剂盒后，请置于-20℃保存。本产品于-20℃条件下至少可稳定保存一年。为保证使用效果，请注意避免多次反复冻融。

III. 产品介绍

Rayscript cDNA Synthesis Kit 包含逆转录酶和一整套特殊试剂组合，其cDNA产物适用于基因克隆、cDNA文库构建，以及定量PCR扩增。本产品是根据可靠实验设计、研发的通用性第一链cDNA合成（逆转录）试剂盒，适用于大多数来源的RNA。

本产品使用的莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶（RNase H-）是一种依赖于RNA的DNA聚合酶，被用于长链RNA模板（>13 kb）的cDNA合成。这个应用过程中，RNase活性的缺失非常重要，因为这种活性在合成长链cDNA所必须的长时间的温育过程中会使模板降解。这种活性的缺失，可用于生产长链cDNA和构建含高比例

全长cDNA的文库。

IV. 实验前准备

注意！在处理化学制品前，请穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

RNA样品准备

避免溶剂、耗材及实验器具中存在RNase，对于RNA相关实验是至关重要的。在准备RNA样品全过程中，需要戴上口罩和手套。小心仔细的按照选择的RNA提取流程进行操作。实验中可购买无RNase的即用型试剂使用，或者将溶剂用DEPC（焦碳酸二乙酯）处理后再经过高压灭菌亦可。实验器具上的RNase可经过250°C干燥3小时灭活。包括微量离心管、移液器吸头等全部耗材用DEPC处理后，再经过高压灭菌以灭活RNase方可使用，同样可购买无RNase的耗材产品使用。

注意事项：

- 为保证使用效果，试剂盒保存于-20 °C，避免储存或放置于4°C 或室温条件下。
- 轻柔颠倒离心管数次以使试剂混合均匀，避免产生泡沫，短暂离心后备用。
- 按照实验流程进行操作，避免RNase污染。
- 所有反应的准备过程在冰上进行，避免RNA的降解。

V. 实验步骤

1. 将试剂组份置于冰上融解，融解后轻柔混匀，短暂离心后置于冰上保存。
2. 准备 RNA-Primer 混合液，按照下表内容将试剂加入无 RNase 的反应管中，至终体积 13 μ l。

混合液组份	体积	质量或终浓度
Total RNA		1 μ g
或者 poly A RNA		10 ng
250 μ M Random Primer	1 μ l	10 μ M
60 μ M Oligo (dT) ₁₈	1 μ l	2.4 μ M
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	加水至 13 μ l	

注意事项：

- 以上表格中RNA质量为推荐的使用量，如果使用total RNA，使用量介于10 ng ~ 5 μ g，如果使用纯化的 poly A RNA，使用量介于1 ng ~ 100 ng。
- 使用者可以根据实验设计选择使用逆转录引物。使用Oligo(dT)₁₈，逆转录将从RNA的Poly A尾起始，使用Random Primer，逆转录将从RNA上不同位点起始。为了获得最佳反应效率，建议同时使用Random Primer和Oligo(dT)₁₈。
- 另外，反应中也可使用自行设计的Sequence-specific Primer作为逆转录引物。

3. 轻柔混匀 RNA-Primer 混合液，短暂离心，置于 65°C 温育 10 min，温浴后立即置于冰上保存。

4. 准备逆转录反应液，按照下表内容，将不同试剂组份加入冰上保存的 RNA-Primer 混合液中，至终体积 25 μ l。

反应液组份	体积	终浓度
RNA-Primer Mix	13 μ l	
5 x RT Reaction Buffer	5 μ l	1x
25 mM dNTP	1 μ l	1 mM
25 U/ μ l RNase Inhibitor	1 μ l	1 U/ μ l
200 U/ μ l M-MLV RTase	1 μ l	8 U/ μ l
ddH ₂ O (RNase/DNase-free)	加水至终体积 25 μ l	

5. 轻柔混匀准备好的反转录反应液，短暂离心，如果同时使用 Random Primer 和 Oligo(dT)₁₈ 作为逆转录引物，置于 37 °C 温育 60 分钟；如果使用 sequence-specific primer 作为逆转录引物，则置于 42 °C 温育 60 分钟。
6. 接着置于 85 °C 温育 5 分钟（终止逆转录反应）。
7. 逆转录产物无需纯化即可直接用于下一步实验。对于反应体系 25 μ l 的 PCR 反应，建议使用 0.5 μ l ~ 2 μ l 未稀释的 cDNA。如果进行 qPCR 反应，建议先用灭菌蒸馏水稀释逆转录产物 5 ~ 20 倍，对于反应体系 20 μ l 的 qPCR 反应，建议使用 2 μ l 稀释的 cDNA。

VI. 常见问题

<p>没有或几乎没有产物</p>	<p>RNA 模板降解</p> <p>RNA 的质量是 cDNA 合成的关键因素。在准备 RNA 样品全过程中，需要戴上工作服、口罩和手套，小心仔细的按照选择的 RNA 提取流程进行操作，使用 RNA 级的试剂和耗材。提取分离的 RNA 需用变性凝胶电泳检测质量。</p> <p>RNA 模板中含有抑制剂</p> <p>RNA 模板中的微量抑制剂（例如胍盐）会抑制 cDNA 合成。用 75%的乙醇重新洗涤 RNA 沉淀并离心。</p> <p>高 G-C 含量模板或者二级结构阻碍反应</p> <p>RT 反应前需要准备 RNA-Primer 混合液。在 PCR 反应中添加反应优化剂，例如 DMSO、甜菜碱等。</p>
<p>产物长于目的片段</p>	<p>PCR 模板中有基因组 DNA 存在。在 RT 反应前使用 DNase I 消化 DNA，设计垮内含子引物或者侧翼序列引物，以避免扩增出基因组 DNA 序列。</p> <p>扩增出错误的片段，请优化 PCR 反应条件。</p>

