



TIANScript cDNA第一链合成 试剂盒 (KR104) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170421

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. RNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



准备操作



将模板RNA在冰上解冻；TIANScripT M-MLV (200 U/ μ l)置于冰上，其它组分置于室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 1

按下表在冰浴条件下配制反应液

组成成分	使用量
oligo (dT) ₁₅ / Random/特异引物	2 μl
Super Pure dNTPs (2.5 mM each)	2 μl
Total RNA	1-5 μg总RNA或 50-500 ng mRNA
RNase-Free ddH ₂ O	补足14.5 μl



Tips

1. 配制反转录混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个反转录反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个反转录反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个反转录反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算引物和dNTP所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中，彻底混匀，短暂离心。

试剂	1个体系的使用量	6个体系的使用量	11个体系的使用量	22个体系的使用量
oligo (dT) ₁₅ / Random/特异引物	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
Super Pure dNTPs (2.5 mM each)	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
混合物总体积	4 μl	24 μl	44 μl	88 μl

3. 计算每个样本所需加入的RNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积
4. 按：引物dNTP混合物—RNA—ddH₂O的顺序配制体系，彻底混匀。

Step 2



70°C 加热5 min后迅速在冰上冷却2 min。简短离心收集反应液。

再在每个反应体系中加入以下各组分。

4 μ l 5 \times First-Strand Buffer（含有DTT）； 0.5 μ l RNasin。之后充分混匀。

为保证加入准确，可按前页所示方法，计算两种组分的总体所需量，预先配成一管混合物，再分至各管中。

Step 3



加入1 μ l (200 U) TIANScript M-MLV，轻轻用移液器混匀。

如果使用随机引物，请在进行下一步操作前将离心管置于25°C，温浴10 min。

Step 4



42°C 温浴50 min

Step 5



95 °C 加热5 min终止反应，之后放置于冰上。如果需要用RNase H处理，进行步骤6；不需处理时，则进行后续实验或冷冻保存。

Step 6



加入1 μ l (2 U) RNase H, 37 °C 温浴20 min以降解RNA。

然后95 °C 加热5 min使酶失活。之后放置于冰上。

Tips



得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。避免反复冻融。

cDNA不建议检测浓度。

进行PCR反应时，用RNase-Free ddH₂O将反应体系稀释到50 μl，取2-5 μl进行PCR反应。