



All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit User Manual

第一链 cDNA 合成（逆转录）试剂盒使用说明书

Cat. No. **QP006** (Old Cat. No. AORT-0020, 20 synthesis reactions)

Cat. No. **QP007** (Old Cat. No. AORT-0060, 60 synthesis reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

使用手册

All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit

- I. 产品介绍
- II. 相关产品
- III. 试剂盒组份
- IV. 实验前准备
- V. 实验步骤
- VI. 实验案例
- VII. 查错指南
- VIII. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 由逆转录酶和一整套特殊试剂组合而成，其合成的 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-）是一种以 RNA 为模板合成互补 DNA（cDNA）的 DNA 聚合酶，适用于长链 RNA 模板（>13 kb）的 cDNA 合成。在此应用中，RNase 活性的缺失非常重要，因为这种活性在合成长链 cDNA 所必须的长时间的孵育过程中会使模板降解。这种活性的缺失，可用于合成长链 cDNA 和构建含高比例全长 cDNA 的文库。

II. 相关产品

产品	描述
All-in-One™ / BlazeTaq™ qPCR Mix	基于 SYBR Green 染料的实时定量 PCR 试剂
All-in-One™ qPCR Primers	高特异、高灵敏度的基因特异验证引物
BlazeTaq™ One-Step RT-qPCR Kit	基于 SYBR Green / 探针法的一步法 RT-PCR 反应试剂
ExProfile™ Gene qPCR Arrays	预制和定制的基因表达量定量检测阵列
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kits 2.0	精确、特异的 miRNA 表达量定量检测试剂盒
All-in-One™ miRNA qPCR Primers	高特异、高灵敏度的 miRNA 特异验证引物
miProfile™ miRNA qPCR Arrays	预制和定制的 miRNA 表达量定量检测阵列
OmicsLink™ Expression-Ready ORF cDNA Clones	多功能多应用的即用型表达克隆

III. 试剂盒组份

All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. Nos. QP006 and QP007) 试剂盒组份如下表所示。

组份	体积	储存条件
200 U/μl M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H-)	1 × 20 μl 3 × (1 × 20) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
5 × RT Reaction Buffer	1 × 100 μl 3 × (1 × 100) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
25 U/μl RNase Inhibitor	1 × 20 μl 3 × (1 × 20) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
25 mM dNTP	1 × 20 μl 3 × (1 × 20) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
60 μM Oligo (dT) ₁₈	1 × 20 μl 3 × (1 × 20) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
250 μM Random Primer	1 × 20 μl 3 × (1 × 20) μl	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
ddH ₂ O(RNase and DNase free)	1 × 1 ml 3 × (1 × 1) ml	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融

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、耗材及实验器具中污染 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。小心仔细的按照所选的 RNA 提取流程进行操作。实验中可购买无 RNase 的即用型试剂进行实验，或者将溶剂用 0.1% 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 干热灭菌 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，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 预混液，按照下表内容将试剂加入无 RNase 的反应管中，补水至终体积为 13 μ l。

混合液组份	体积	质量或 25 μ l 终浓度
Total RNA 或者 poly A RNA		1 μ g 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)	补水至 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 预混液，短暂离心，置于 65°C 孵育 10 min，之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 \times RT Reaction Buffer	5 μ l	1 \times
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)	补水至终体积 25 μ l	

5. 轻柔混匀准备好的逆转录反应液，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. 置于 85 °C 孵育 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 μl 的 PCR 反应，建议使用 0.5 μl ~ 2 μl 未稀释的 cDNA。对于反应体系为 20 μl 的 qPCR 反应，建议使用 2 μl 1:5 ~ 1:20 稀释的 cDNA。

VI. 实验案例

以下实例对使用本产品中逆转录酶的效率进行了测试和评估。试验中不同基因或基因片段的扩增结果反映了使用本试剂盒（以 oligo(dT)₁₈ 为逆转录引物）合成 cDNA 确实可靠、有效。

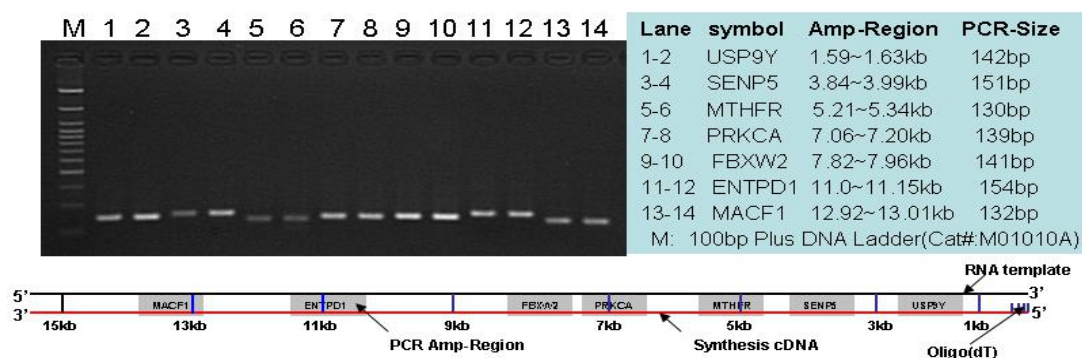


图 1. 使用 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 有效合成 cDNA 示意图。

以 oligo(dT)₁₈ 为逆转录反应的引物，用 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 将人胎盘总 RNA 逆转录为 cDNA，利用 All-in-One™ qPCR Mix（GeneCopoeia Cat.No.QP001）分别对由人胎盘 RNA 为模板合成的 cDNA 的不同长度的基因片段进行 qPCR 扩增。其中，MACF1 的阳性扩增结果（产物）表明可以完全逆转录长达 13 kb 的 RNA。

VII. 查错指南

<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，需要穿上工作服、戴上口罩和手套，小心仔细地按照选择的 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。用无水乙醇重新沉淀 RNA 并用 75%乙醇洗涤沉淀。</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，设计跨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>

VIII. 使用许可与质量保证

使用限制

以下条款适用于 All-in-One™ First-cDNA Synthesis Kit 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2020, GeneCopoeia, Inc