

HP 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA Remove) RT101

■ 产品概述

本产品为 1 链 cDNA 反转录试剂盒。试剂盒中包含优化的 5×gDNA 去除预混液、RT enzyme mix 及 10×RT Buffer。其中的 5×gDNA Remove Mix 能有效清除 RNA 样本中残留的 gDNA，从而保证后续 PCR 实验的特异性。而优化后的 10×RT Buffer 能够确保高效的第一链 cDNA 合成效率。试剂盒中包含的单组分逆转录引物 Oligo (dT) 20 VN 和 Random primers，方便用户可灵活选择进行后续实验。本试剂盒既可合成用于克隆等下游实验的全长 cDNA (可达 20 kb)，也可以合成高度均一的用于 qPCR 定量的 cDNA。

■ 产品组成

组分	RT101 100 rxns/20 µl
5×gDNA Remove Mix	200 µl
10×RT Buffer ^{*1}	200 µl
HP RT Enzyme Mix ^{*2}	200 µl
Oligo (dT) 20 VN	100 µl
Random primers	100 µl
RNase Free H ₂ O	1 ml

*1. 含 dNTP。 *2. RNase inhibitor。

◆ 后续实验为 PCR 时操作流程

1. RNA 变性

组分	1×
RNase Free H ₂ O	Up to 8 µl
Total RNA	10 pg-5 µg
or polyA ⁺ RNA	10 pg-500 ng

65℃ 孵育 5 min，迅速置于冰上骤冷，并在冰上静置 2 min。

2. gDNA 去除体系配制

组分	1×
5×gDNA Remove Mix	2 µl
第 1 步的反应液	8 µl

移液枪轻柔吹打混匀，42℃ 孵育 2 min。

3. 第一链 cDNA 合成反应液配制

组分	1×
第 2 步的反应液	10
10×RT Buffer ^{*1}	2 µl
HP RT Enzyme Mix ^{*2}	2 µl
Oligo (dT) 20 VN	1 µl
or Random primers	1 µl
or gene specific primer (GSP)	2 pmol
RNase Free H ₂ O	Up to 20 µl

反应程序

反应温度	时间
25℃ ^{*1}	5 min
37℃ ^{*2}	45 min
85℃	5 sec

*1: 使用 Random primers 时需要此步骤；使用 GSP 或 Oligo(dT)20 VN 时省略此步骤。

*2: 对于富含复杂结构和高 GC 的模板，可将温度调整至 50℃，有助于提高反转录效率和产量。

◆ 后续实验为 qPCR 时操作流程

1. gDNA 去除体系配制

组分	1 ×
RNase Free H ₂ O	Up to 10 μl
5×gDNA Remove Mix	2 μl
Total RNA	10 pg-1 μg
or polyA+ RNA	10 pg-100 ng

用移液枪轻柔吹打混匀。42℃孵育 2 min。

2. 逆转录反应体系配制

组分	1 ×
第 1 步的反应液	10
10×RT Buffer ^{*1}	2 μl
HP RT Enzyme Mix ^{*2}	2 μl
Oligo (dT) 20 VN	1 μl
Random primers	1 μl
RNase Free H ₂ O	4 μl

用移液枪轻柔吹打混匀。

反应程序

反应温度	时间
37℃ ^{*1}	15 min
85℃	5 sec

^{*1}: 对于富含复杂结构和高 GC 的模板, 可将温度调整至 50℃, 有助于提高反转录效率和产量。

■ 保存条件

-30~-15℃保存, 干冰/-20℃运输。

10×RT Buffer 中含有高浓度 DTT, 低温下可能有沉淀析出。使用前请还原至室温并轻摇混匀, 待沉淀重新溶解后使用。

■ 注意事项

- ✓ 本制品每次使用时务必使用桌面离心机点离后用移液枪轻柔地吹打混匀, 避免剧烈震荡, 以免酶失活。
- ✓ 反转录过程中使用的相关耗材需确保无酶无菌。
- ✓ 反转产物可立即用于 qPCR/PCR 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。cDNA 应避免反复冻融。