

M5 First Strand cDNA Synthesis Kit

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 First Strand cDNA Synthesis Kit	100T	MF011-T
M5 First Strand cDNA Synthesis Kit	200T	MF011-01
M5 First Strand cDNA Synthesis Kit	2x200T	MF011-02

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步实验配制的 cDNA 第一链合成试剂盒。该试剂盒中使用的 M5 M-MuLV RTase 逆转录酶是 M-MLV 由来的新型高效逆转录酶，新颖突变位点大幅提升酶的转录活性，cDNA 第一链合成的效率和产量更高，可利用 pg 级的总 RNA 或 mRNA 合成 cDNA 第一链。点突变消除 RNase H 活性，酶的延伸性能提高，有效改善逆转录酶与 RNA 模板的亲合力，可获得长至 12 kb 的 cDNA。精心优化的 RT Buffer 使逆转录酶应用范围更广，对后续的 PCR 以及定量 PCR 实验兼容性高。该试剂盒配备所有逆转录试剂，使用简单方便。适用于第一链 cDNA 的合成和后续的 RT-PCR、RT-qPCR，以及全长 cDNA 文库的构建等。

【产品特点】

1. 高效的逆转录效率：新颖突变位点大幅提升酶活性，获得更高产量的 cDNA。
2. 良好的延伸能力：点突变消除 RNase H 活性，改善逆转录酶与 RNA 模板的亲合力，可获得长至 12 kb 的 cDNA。
3. 灵敏度高：可利用 pg 级的总 RNA 或 mRNA 模板合成 cDNA 第一链。
4. 使用方便：逆转录试剂盒中已配备所有逆转录试剂，仅需准备模板即可轻松完成逆转录。

【产品组分】

	100T	200T
M5 M-MuLV RTase (200 U/μl)	100 μl	200μl
5x M5 M-MuLV RTase Buffer*	500 μl	1 ml
Primer Mix	240 μl	480μl
dNTP Mix, 2.5 mM	500 μl	1 ml
DTT, 0.1M	240μl	480μl
RNase-Free Water	1 ml	2x1ml

【注意事项】

1. 在操作过程中应避免 RNase 污染，防止 RNA 降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行 RNA 操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用 0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37°C 处理 12 小时，并在 120°C 下高压灭菌 30 分钟后使用，或者将玻璃器皿在 180°C 下干热灭菌 60 分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用 0.1%的 DEPC 处理后进行高压灭菌。
3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20°C，避免反复冻融。
4. 若起始 RNA 的量小于 50 ng，建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。

【操作流程】

注意：1 ng-5 µg 总 RNA 可建立 20 µl 反应体系，如果总 RNA 量大于 5 µg，请按比例扩大反应体系。

1. 将 RNA 模板、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、M5 M-MuLV RTase 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为 13 µl 。

Primer Mix	2 µl
dNTP Mix, 2.5mM each	4 µl
RNA 模板	≤2 µl (1~5 µg 总 RNA 或 0.1~0.5 µg poly(A) mRNA)
RNase-Free Water	补足至 13 µl

3. 70°C 孵育 10 分钟，迅速冰浴 2 分钟。
4. 短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
5. 继续向以上反应液中加入以下试剂：

5x RTase Buffer	4 µl
DTT, 0.1M	2 µl
M5 M-MuLV RTase	1 µl
	至 20 µl

注意：1) 若起始 RNA 的量小于 50 ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂 (RNasin)。

2) Primer Mix 由 Oligo (dT) 和 Random Primer 配制而成。如果需要单独的 Oligo 18(dT)(MF217), Oligo15(dT)(MF294) 或者 Random Primer (MF221)，可以向聚合美单独购买或者定制。

6. 进行 cDNA 第一链合成：

50°C 孵育 30-50 分钟，85°C 孵育 5 分钟。

7. 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。
8. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，加入量应小于 PCR 反应体系的 1/10，或置于 -20°C 长期保存。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。