**Reverse Transcription Kit**

**货号：KTSM2209**

**■ 制品说明：**

本试剂盒用于第一链cDNA的合成，包含第一链合成的所有试剂，使用锚定Oligo(dT)18引物，提高特异性，配备精心优化的5×Rtase buffer，有效应对RNA高级结构及抑制逆转录酶非特异结合，可高效的完成第一链cDNA合成。

**■产品组成**：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **包装规格（100T/盒）** |
| Rtase(200U/μl) | 100 μl |
| Rnasin(40U/μl) | 50 μl |
| 5×Rtase buffer | 400 μl |
| Anchored Oligo(dT)18(50 μM) | 100 μl |
| Random Primer (50 μM) | 100 μl |
| dNTPs(10 mM，each) | 100 μl |
| RNase-free ddH2O | 2×1 ml |

**■保存**：

-20 ℃保存1年。

**■产品特点**：

（1）无RNaseH活性，高效逆转录酶活性；

（2）cDNA长片段合成；

（3）广泛适用各种底物，高效转录复杂二级结构RNA底物模板。

**■用途**：

适用于cDNA第一链合成，杂交，RT-PCR，RACE，cDNA文库构建等。

**■实验操作步骤**：

**第一链cDNA合成**

（1）将模板RNA取出冰上解冻，取出试剂盒各组分试剂，室温（15~25℃）解冻后，漩涡震荡混匀，然后短暂离心后放置与冰上；

（2）在RNase-free的离心管中按下表体系配制反应混合液，操作在冰浴中进行：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| RNA | Total RNA:10ng~5μg;  或Poly(A)mRNA:10pg~500ng |
| Primer | Anchored Oligo(dT)18(50 μM) 1 μl  或Random Primer(50 μM) 1 μl  或GSP（Gene Specific Primer） 1~15 pmol |
| dNTPs | 1 μl |
| ddH2O | 加水至14.5 μl |

（3）65℃保温5 min后迅速冰浴2 min；

**注：65℃热处理可使RNA变性，降低二级结构，提高逆转录效率。**

（4）在上述管中加入下列逆转录酶反应液：

|  |  |
| --- | --- |
| **产品名称** | **包装规格** |
| 热处理反应液 | 14.5 μl |
| 5×Rtase buffer | 4 μl |
| Rtase(200U/μl) | 1 μl |
| Rnasin(40U/μl) | 0.5 μl |
| 总体积 | 20 μl |

（5）将上述反应液混匀；

（6）使用Random Primer需要30℃保温10 min，使用Anchored Oligo(dT)18或GSP可以省略此步骤；

（7）42℃保温20~60 min；

（8）95℃保温5 min热失活后，冰上放置用于下游实验或冷冻保存。

**2. 反应条件设置**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **步骤** | **温度** | **时间** |
| Step1(UDG处理) | 25℃ | 时间 |
| Step2(灭活，热激时间) | 95℃ | 5 min |
| Step3(变性) | 94℃ | 2 min |
| Step4(退火) | 55℃ | 30 sec |
| Step5(循环) | Go To Step3 for 40 cycls |  |

**注：变性条件根据使用的PCR仪型号和反应管种类进行设定。**