

温育 10 分钟，再冰浴 5min 后继续后续实验；逆转录长链 RNA (> 2kb) 时，建议在 42℃ 左右进行。

**** 95℃ 加热使 AMV Reverse Transcriptase 失活并阻止其与 DNA 结合。

使用提示

1. RNA 模板可以采用总 RNA 或 mRNA，建议使用 Biozol(BSC51M1)制备高质量 RNA；
2. RT 实验应避免 RNase 污染，可采用以下措施：
 - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有 RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
 - 2) RT 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作 RNA；
 - 3) RT 实验相关耗材应使用干热灭菌（180℃，60 分钟）或用 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37℃ 处理 12 小时后在 121℃ 高压灭菌 30 分钟；
3. AMV 逆转录酶和 RNase 抑制剂在取用之前应离心后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-20℃；
4. dNTP 应避免反复冻融以免失效；
5. 引物的选择可根据具体情况，Oligo-dT 适用于具有 PolyA 尾的 RNA(一般是真核生物的 mRNA)，Random Hexamer Primer 适用于所有 RNA，尤其适用于有复杂二级结构的 RNA，特异性引物适用于已知模板序列的 RNA；
6. PCR 反应中 MgCl₂ 浓度可依据不同条件进行调整，当目的片段长度大于 2kb 时，我们建议增加 MgCl₂ 浓度，以 0.5mM 间隔梯度增加。

RT-PCR 实验必需用品

仪器和耗材	试剂
离心机	DEPC(焦碳酸二乙酯)
微量移液器	移液器吸头
RNase free 离心管	电泳缓冲液
水浴装置或金属浴装置	上样缓冲液
电泳及 UV 装置	DNA Marker

参考文献

1. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., and Beard, J.W. (1979) *J.Virol.* 29(2):517-522.
2. Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology, Volume 152. pp 316-325. Edited by Shelby Berger and Alan R. Kimmel. Academic Press, Inc.

BioRT cDNA First Strand Synthesis Kit

User's Manual

BioRT cDNA 第一链合成试剂盒

说明书

Cat No.: BSB09M1

TECHNICAL SUPPORT:

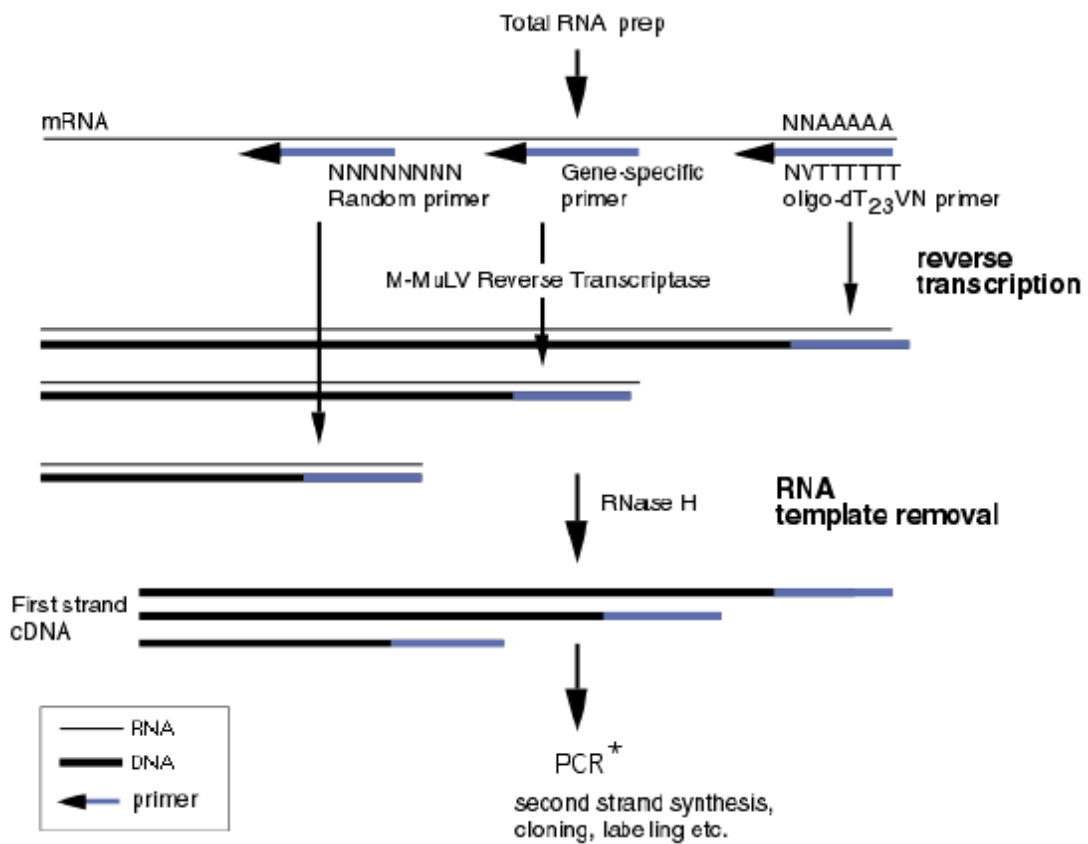
For technical support, please dial phone number :
0086-571-87774567-5278, 5211 or 800-857-1279
email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

产品说明

BioRT cDNA 第一链合成试剂盒，是在反转录酶（AMV）的作用下，以动植物来源的 RNA 为模板，利用 Oligo(dT)或者随机引物合成 cDNA 第一条链。该试剂盒采用美国先进技术生产的高质量逆转录酶(AMV 酶)进行的逆转录反应，可得到高产量的 cDNA，并可逆转录长达 10kb 的 cDNA，同时 AMV 逆转录酶有较高的热稳定性，其反应温度可高达 60℃，特别可以逆转录具有复杂二级结构的 RNA 模板。该产品包含了逆转录反应必需的所有反应组分。

RT-PCR 原理



Components (100 rxns)

AMV Reverse Transcriptase(5U/μl)	52 μl
5 x RT Buffer	500 μl
dNTP Mixture(10mM)	200 μl
RNase inhibitor(40U/μl)	52 μl
Oligo-dT(18)	52 μl
Random Primer	52 μl
RNase free H ₂ O	1 ml

Store at -20 °C

Protocol
RT reaction

a、Reaction setup for cDNA synthesis

5 x RT Buffer	2 μl
dNTP Mixture (10mM)	1 μl
Oligo-dT	
or Random Hexamer Primer**	0.5 μl
or special downstream primer	
RNase inhibitor (40U/ul)	0.5 μl
AMV Reverse Transcriptase (5U/ul)	0.5 μl
Sample RNA*	x μl
RNase free H ₂ O	5.5-x μl
total	10 μl

Notes

* When you do controls. Sample RNA valume can be add up to 5.5ul (≤1ug).

b、RT reaction condition

(room temperature, 10min) **

42-60°C ***, 45min

95°C ****, 5min

ice bath, 5min

cDNA for PCR reaction.

Notes

** If using random Hexamer Primer, holding at room temperature for 10 minutes.

*** Reaction temperature can be elevated for RNA template with second structure, lower than 60°C.

**** Heat to 95°C let AMV Reverse Transcriptase denature.

Using Tips

1. Total RNA or mRNA can be used as RNA template, and we suggest using Biozol(BSC51M1)to isolate high quality RNA;
2. RNase contamination should be avoided and follow the measures:
 - 1) Ware one time gloves and respirator because of the RNases in saliva and skin;
 - 2) Use special instruments and consumables and handle in specific areas;
 - 3) Consumables should be treated at 180°C for 60min or 37°C for 12 hours with 0.1% DEPC H₂O followed by sterilized at 121°C for 30min;
3. AMV reverse transcriptase, Taq polymerase and RNase inhibitor should be slowly pipetted after centrifuging, and put back at -20°C later;
4. Avoid frequently freezing and thawing dNTP;
5. Specific primers should be used and concentration of primers should be optimized and We suggest 0.4μM as a starting point for optimizing; Oligo-dT and Random primers are not suitable for this kit;

Required materials for RT

Instruments and consumables	Reagents
Centrifuge	DEPC
Pipettes	Tips
RNase free tubes	Electrophoresis Buffer
Water bath instruments	Loading Buffer
Gel electrophoresis instruments	DNA Marker

Reference

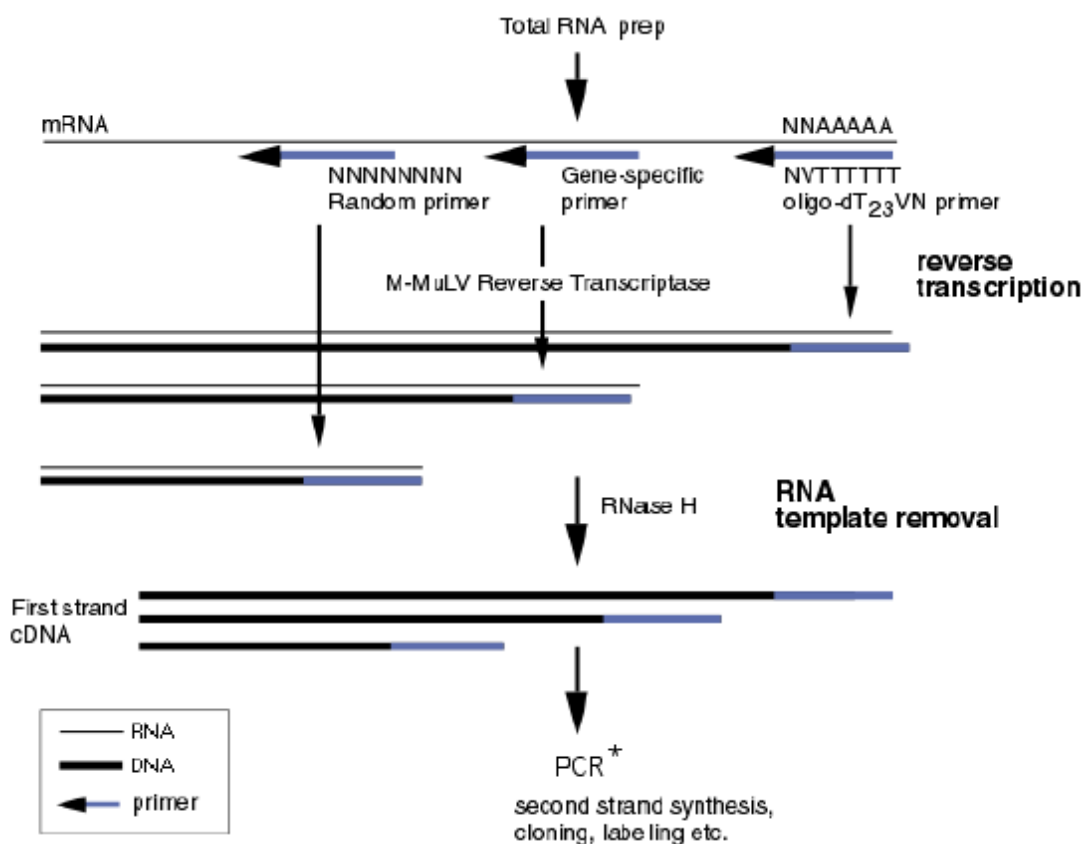
1. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., and Beard, J.W. (1979) *J. Virol.* 29(2):517-522.
2. Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology, Volume 152. pp 316-325. Edited by Shelby Berger and Alan R. Kimmel. Academic Press, Inc.

Description

BioRT cDNA First Strand Synthesis Kit provides the materials needed to rapidly and reliably synthesis first strand cDNA from RNA. It uses AMV reverse transcriptase to synthesize first strand cDNA from an RNA population.

The kit includes all the necessary reagents for first strand cDNA synthesis. The kit includes both random primers and oligo(dT18) primers. The user can choose either of these or alternatively use gene specific primers. The reverse transcriptase in the BioRT cDNA First Strand Synthesis Kit is AMV, which provides up to 60°C reverse transcriptase temperature and provides higher sensitivity and higher yield to cDNA's synthesis and PCR. The kit can synthesis up to 10kb cDNA. The reaction buffer is optimized for a kind of reaction system.

RT Principle



试剂盒组成 (100次使用量)

AMV Reverse Transcriptase(5U/μl)	52 μl
5 x RT Buffer	500 μl
dNTP Mixture(10mM)	200 μl
RNase inhibitor(40U/μl)	52 μl
Oligo-dT(18)	52 μl
Random Primer	52 μl
RNase free H ₂ O	1 ml

保存 -20℃

实验操作 Protocol
RT 反应

a、按以下条件配制 RT 反应液

5 x RT Buffer	2 μl
dNTP Mixture(10mM)	1 μl
Oligo-dT	
或 Random Hexamer Primer **	0.5 μl
或特异性下游引物	
RNase inhibitor(40U/ul)	0.5 μl
AMV Reverse Transcriptase	0.5 μl
实验样品 RNA *	x μl
RNase free H ₂ O	5.5-x μl
总体积	10 μl

注：*实验样品 RNA 体积根据浓度确定，总量小于等于 1ug 总 RNA；当实验样品 RNA 的表达数量较少时，可加至 5.5ul，同时在反应体系中相应地减少 RNase free H₂O 的量。

b、按以下条件进行逆转录反应

(室温	10min) **
42-60℃ ***	45min
95℃ ****	5min
冰浴	5min

注：** 对于随机六聚体引物，在室温温育 10 分钟后，再进行逆转录反应。

*** 对于有复杂二级结构的 RNA 模板，逆转录温度可适当提高，不可高于 60℃；也可以加模板和引物后 70℃