

M5 HiPer Second Strand cDNA Synthesis Kit

第二链 cDNA 反转录试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Second Strand cDNA Synthesis Kit	10T	MF1129-01

【储存条件】 -20°C, 避光保存。

【产品简介】

本产品是一种在合成了 cDNA 第一链的基础上去除 RNA-DNA 杂合链中的 RNA 链并合成 cDNA 第二链, 最终形成双链 cDNA 的试剂盒。本试剂盒包含了进行 cDNA 第二链合成所需的各种试剂。本试剂盒采用 RNase H 使 RNA-DNA 杂合链中的 RNA 产生切口, 此时 DNA Polymerase I 可以通过切口平移(nick translation)反应催化形成 cDNA 第二链。使用本试剂盒合成的双链 cDNA, 可以直接用于后续的常规 PCR、real-time PCR、cDNA 文库的构建等。

【产品组分】

RNase H(1U/μl)	10μl
DNA Polymerase I(10U/μl)	30μl
Reaction Buffer(10X)	100μl

注意: 本试剂盒用于体积为 20 微升的 cDNA 第一链合成反应的后续反应时, 足够进行 10 个 cDNA 第二链样品的合成。

【注意事项】

- 1、进行第二链合成时, dNTP 比较适当的最终浓度约为 0.2mM。如果最终浓度过低, 在反应体系中需要适当补充 dNTP。
- 2、如果希望获得平末端的双链 cDNA, 可以用 T4 DNA Polymerase(MF320)或 DNA 末端平滑试剂盒(MF300)处理。

【操作步骤】

1. 用反转录酶, 例如 M-MLV 反转录酶(RNase H-) (MF009)或 cDNA 第一链合成试剂盒(RNase H-) (MF166-plus)合成 cDNA 第一条链, 70°C 孵育 10 分钟终止反应。

2. 在冰浴上向已经合成第一条链的 20μl 反应体系中依次加入如下试剂:

Reaction Buffer (10X)	8μl
无核酸酶去离子水	68μl
RNase H (1U/μl)	1μl
DNA Polymerase I (10U/μl)	3μl

3. 按上述体系配好之后, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体。

4. 15°C 孵育 2 小时。**注意: 反应温度不能超过 15°C。**

5. 加入 5μl 0.5M EDTA (pH8.0)混匀, 以终止反应。

6. 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化合成的双链 cDNA, 也可以使用适当的 DNA 纯化试剂盒(MF030)进行纯化。

【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。