TIANGEN

FastQuant cDNA第一链合成试剂盒 (KR106)

操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170420

实验准备

1. RNA 样本
2. 移液器及配套枪头（RNase-free）
3. 1.5 ml 离心管（RNase-free），200 μl PCR管（RNase-free）
4. 涡旋振荡器，台式离心机，金属浴/ PCR仪

Step 1

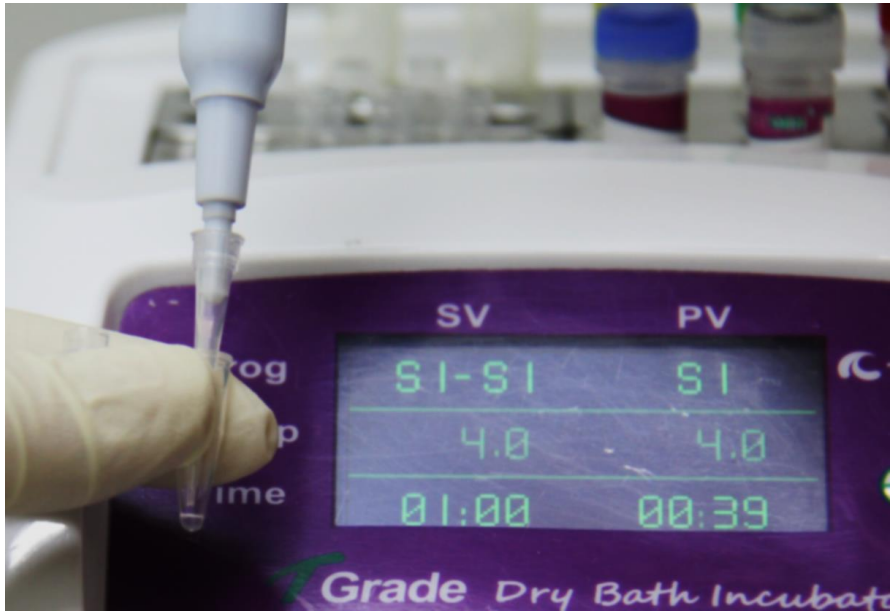
将模板RNA在冰上解冻；RT Enzyme Mix置于冰上，其它组分置于室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2

按照表1的基因组DNA（gDNA）的去除体系在冰浴条件下配制去除混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μl
Total RNA	50 ng-2 μg
RNase-Free ddH_2O	补足到10 μl

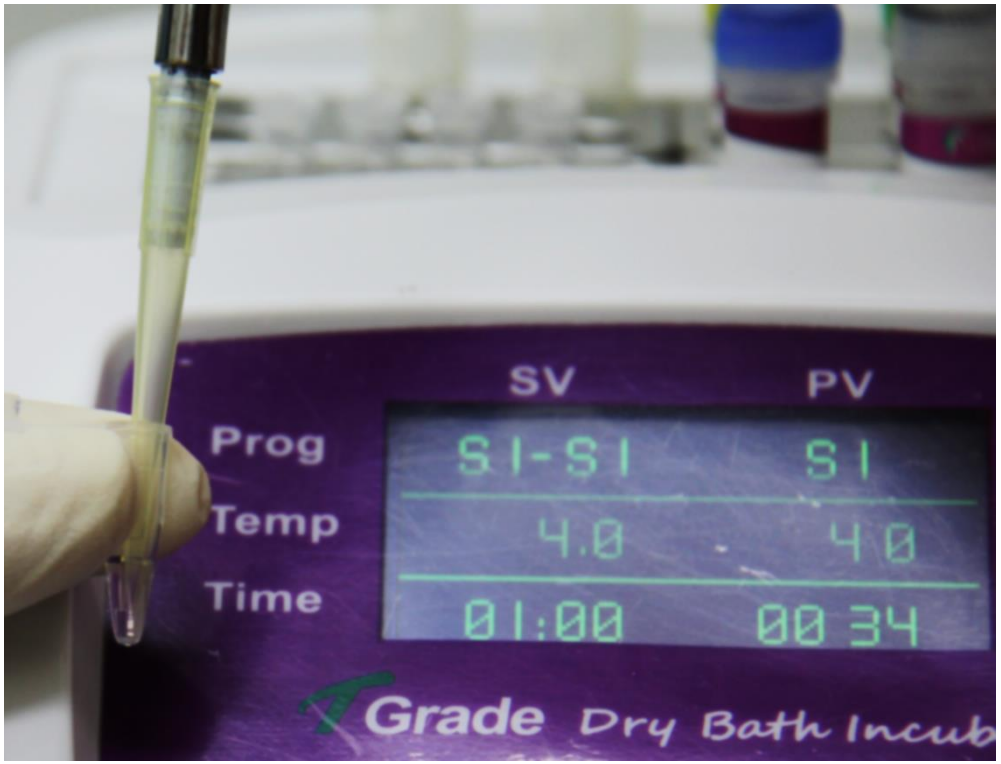


Step 3

按照表2的反转录反应体系在冰浴条件下配制反转录混合液。

表2 反转录反应体系

试剂	使用量
10×Fast RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	1 μl
FQ-RT Primer Mix	2 μl
RNase-Free ddH_2O	5 μl
总体积	10 μl



Tips

1. 按照表2的反转录反应体系配制反转录混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个反转录反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个反转录反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个反转录反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。

2. 按配制数量计算每个组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中，彻底混匀，短暂离心。

试剂	1个体系的使用量	6个体系的使用量	11个体系的使用量	22个体系的使用量
10×Fast RT Buffer	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
RT Enzyme Mix	1 μl	6 μl	11 μl	22 μl
FQ-RT Primer Mix	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
RNase-Free ddH_2O	5 μl	30 μl	55 μl	110 μl
总体积	10 μl	60 μl	110 μl	220 μl

Step 4

在每一个gDNA去除混合液（10 μl）中，加入10 μl 反转录混合液，加入后充分混匀，形成20 μl的反应体系。

Step 5

42℃，孵育15 min。

Step 6

95℃，孵育3 min之后放于冰上。完成实验。

Tips

得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。保存前应分装，避免反复冻融。cDNA不建议检测浓度。