



RobustScript III第一链cDNA合成试剂盒

组分	#M0401(50次20 µl体系)	#M0402(250次20 µl体系)
RobustScript III反转录酶 (200 U/µl)	50 µl	250 µl
5× 第一链合成缓冲液	300 µl	1500 µl
0.1 M DTT	150 µl	750 µl
dNTP Mix(各10 mM)	50 µl	250 µl
重组RNase抑制剂(40 U/µl)	50 µl	250 µl
RNase-free Water	1000 µl	5000 µl

概述：RobustScript III第一链cDNA合成试剂盒采用RobustScript III反转录酶合成第一链cDNA。RobustScript III反转录酶是基因工程改造后的M-MLV反转录酶(莫洛尼氏鼠白血病病毒pol基因)，降低了RNase H活性，增强了热稳定性(最高反应温度55°C)，具有更好的特异性和产量。RobustScript III反转录酶可合成cDNA的最高长度达12 kb。

第一链cDNA的合成：

1. 将以下组分加入无核酸酶的微量离心管中：

oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/mL)*	1 µl
总RNA / mRNA	10 pg-5 µg/10 pg-500 ng
dNTP Mix(各10 mM)	1 µl
RNase-free Water	至13 µl

*注：也可以使用50-250 ng随机引物或2 pmole基因特异性引物

2. 混合物在65°C加热5分钟后，迅速置于冰上。加入：

5× 第一链合成缓冲液	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNase抑制剂(40 U/µl)	1 µl
RobustScript III反转录酶	1 µl

3. 混匀组分，如果使用的是随机引物，应在25°C下孵育5分钟。

4. 50°C孵育30-60分钟，如果使用基因特异性引物、复杂模板或富含二级结构的模板需将反应温度增加到55°C。

5. 70°C加热15分钟以终止反应。

推荐PCR反应体系和程序：

1. 在PCR反应管中加入下列成分：

10× PCR缓冲液	5 µl
dNTP Mix(各10mM)	1 µl
上游扩增引物 (10 µM)	1 µl
下游扩增引物 (10 µM)	1 µl
Taq DNA聚合酶 (5 U/µl)	0.5 µl
cDNA (来自于第一链合成反应)	2 µl
灭菌蒸馏水	至50 µl

2. 变性: 94°C加热2分钟。

3. 退火和延伸条件需要根据目标片段长度等设定。进行15-40个PCR循环。

注意事项：

使用适宜存放在冰盒或冰浴上，使用完毕后立即放置于-20°C保存