



InRcute IncRNA cDNA第一 链合成试剂盒（去基因组） (KR202) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170927

WWW.TIANGEN.COM

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 μ l 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；5×gDNA Buffer、InR-RT Primer Mix、10×InR RT Buffer、RNase-Free ddH₂O在室温（15-25℃）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）的去除体系配制**去除混合液**，彻底混匀。简短离心，并置于42°C，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA	—	10 ng-2 μ g
5 \times gDNA Buffer	2 μ l	1 \times
RNase-Free ddH ₂ O	补足到10 μ l	—

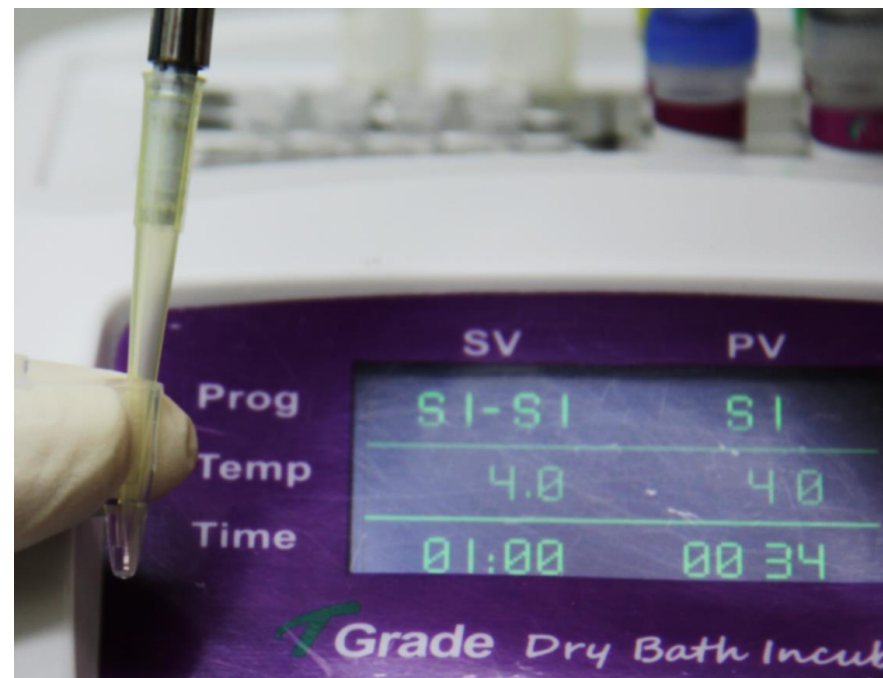


Step 3

按照表2的反转录反应体系在冰上配制反转录混合液。

表2 反转录反应体系

试剂组分	体积	终浓度
10×InR RT Buffer	2 μl	2×
InR RT Enzyme Mix	1 μl	—
InR-RT Primer Mix	2 μl	—
RNase-Free ddH ₂ O	补足到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×InR RT Buffer	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
InR RT Enzyme Mix	1 μl	6 μl	11 μl	22 μl
InR-RT Primer Mix	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
RNase-Free ddH ₂ O	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 μ l）中，加入10 μ l 反转录混合液，加入后充分混匀，形成20 μ l的反应体系。



Step 5



42°C, 孵育15 min。

Step 6



95°C， 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。