

Version: AG 2.0 (2023.12.29修订)

SPARKscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (With gDNA Eraser)

目录号: AG0302

01/产品组分

序号	组分	AG0302-A	AG0302-B
		50 rxn(20 μL/rxn)	100 rxn(20 μL/rxn)
1	SPARKscript II Reverse Transcriptase(200 U/μL)	50 μL	100 μL
2	RNase Inhibitor(40 U/μL)	50 μL	100 μL
3	gDNA Eraser	50 μL	100 μL
4	5×SPARKscript II RT Buffer	1 mL	1 mL×2
5	dNTPs (10 mM each)	200 μL	400 μL
6	Random primer(N6)(100 μM)	100 μL	200 μL
7	Oligo(dT) ₁₈ (100 μM)	100 μL	200 μL
8	RNase Free H ₂ O	1 mL	1 mL×2

02/保存条件

本产品所有组分-20°C保存。

03/产品概述

SPARKscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (With gDNA Eraser) 是含有基因组 DNA 去除步骤的 cDNA 第一链合成专用试剂盒, 包含 cDNA 第一链合成所需的所有试剂 (SPARKscript II Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、Random Primer、Oligo(dT) Primer、dNTPs、Buffer)。

试剂盒中的 SPARKscript II Reverse Transcriptase 是对 M-MuLV (RNase H-) 进行基因工程改造, 表达并纯化的高温逆转录酶, 比 M-MuLV (RNase H-) 提高了热稳定性。该酶可以在高温条件下 (50°C) 进行 cDNA 第一链的合成, 具有热稳定性强, 灵敏度高, 特异性高, 聚合能力强等优点。另外, 试剂盒中含有 gDNA Eraser, 以 RNA 为模板进行 cDNA 第一链合成时, 可以同步去除基因组 DNA 污染。同时试剂盒中还提供了单独成管的反转录引物 Oligo(dT)₁₈ 和 Random primer(N6), 既可合成用于克隆的全长 cDNA, 又可

合成用于 qPCR 的 cDNA。

04/适用范围

第一链 cDNA 合成；可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 避免 RNase 污染。
- ◇ 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
- ◇ 当模板含量较低或后续 PCR 扩增片段过长时可以适当延长逆转录时间。

06/第一链cDNA合成

以20 μL反应体系为例：

1. 将模板 RNA 和所有试剂组分在冰上解冻备用，RNase Free H₂O 可在室温（15-25°C）解冻。使用前将每种溶液轻弹或轻微涡旋混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 按照下表配制混合液，建议使用 PCR 管冰上配制：

Components	Volume
模板RNA	总 RNA(50 ng-5 μg)
	mRNA(10 pg-500 ng)
	特异性 RNA(0.01 μg)
引物	Oligo(dT) ₁₈ (100 μM) 1 μL
	Random primer(N6)(100 μM) 1 μL
	基因特异性引物 15-20 pmol
5×SPARKscript II RT Buffer	4 μL
RNase Inhibitor(40 U/μL)	1 μL
gDNA Eraser	1 μL
dNTPs (10 mM each)	2 μL
SPARKscript II Reverse Transcriptase	1 μL
RNase Free H ₂ O	up to 20 μL

▲注：带Poly A尾的真核生物mRNA和一些带Poly A尾的病毒RNA，反转录引物可以选择Oligo(dT)₁₈，原核生物或者不带Poly A尾的病毒mRNA无法使用Oligo dT，因此反转录引物只能选择Random Primer N6（随机引物N6）。

▲注：cDNA后续进行PCR扩增长片段，一般用Oligo dT或者基因特异性引物，不建议使用随机引物；cDNA后续进行qPCR，一般使用Oligo dT和随机

引物的混合物，可以避免3'端和5'端的扩增偏好性。

▲注：如果RNA浓度低或者为了提高灵敏度，可先将RNA中加入gDNA Eraser，42°C消化5 min，85°C加热5 min终止反应。再配置逆转录体系（不含gDNA Eraser）进行反应。

▲注：可选步骤（一般不需要）：如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构，可以先只加RNA模板、引物和RNase Free H₂O混匀，65°C变性5 min，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。

3. 用移液器轻轻吹打至充分混匀，短暂离心收集至管底。

4. 如用Oligo(dT)₁₈或基因特异引物(GSP)，50°C孵育15-30 min；如用Random Primer，25°C孵育5 min，50°C孵育15-30 min。

5. 85°C加热5 min，终止反应。

▲注：得到的cDNA产物可立即用于PCR反应，不立即使用应在-20°C保存，长期存放建议分装后在-70°C保存；cDNA应避免反复冻融。

07/RT-PCR

取适量反转录产物（一般未稀释 cDNA 原液加入量不超过 PCR 反应体积的 1/10）进行后续 PCR 实验。

08/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0202 SPARKeasy 组织/细胞RNA快速提取试剂盒（含基因组DNA清除柱）

AC0205 SPARKeasy 细胞RNA快速提取试剂盒

AC1705 高效固体表面RNase清除剂

AC1709 RNase Free and DNase Free纯水

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

AH0105 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix

AF0802 2×SparkHiFi Max Master Mix（with dye）

AF0102 2×Spark Taq PCR Master Mix（with dye）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

