**cDNA Synthesis Kit, 50 Tests**

کیت استخراج cDNA یک کیت ایده آل برای سنتز واکنش cDNA از mRNA تخلیص شده یا کل RNA می باشد. این کیت تمام اجزای سازنده برای سنتز یک cDNA را فراهم می کند. به عنوان مثال رونوشت های معکوس، مهار کننده RNase، اولیگو dT و غیره .

**روش استخراج:**

**1. RNA الگو**

مخلوط واکنش 20 میکرولیتری زیر را می توان برای 1pg – 2 µg از کل RNA یا pg 10- 500 ng از poly (A) RNA استفاده نمود.

| اجزاء | | غلظت | مقدار |
|---|---|---|---|
| RNAمورد استفاده برای یک ستون | کل RNA | - | µl (up to ×2µg) |
| | Poly (A) RNA | - | µl (up to ×500ng) |
| پرایمر مورد استفاده برای یک ستون | Oligo dT | 50 µM | 1 µl |
| | ژن خاصی از پرایمر | 2µM | |
| | Random Hexamer | 50 µL ng/ | |
| dNTPs | | 10 m M | 1 µl |
| آب عاری از نوکلئاز | | - | به حجم رساندن مخلوط با به 14 میکرولیتر |

## 2- First- Strand Synthesis of cDNA

1- ترکیب زیر در یک تیوب عاری از نوکلئاز انجام گیرد.

2. مخلوط را به آرامی spin کرده تا همه مخلوط در انتهای تیوپ جمع آوری شود.
3. قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور 65°C به‌مدت 5 دقیقه و قرار دادن به مدت حداقل 1 دقیقه بر روی یخ
4. اضافه کردن اجزای زیر به مخلوط واکنش:

| اجزاء | مقدار |
|---|---|
| 10X RT buffer | 2µl |
| M1 Buffer | 2µl |
| RTase | 1 µl |
| RNase inhibitor | 1 µl |

5. پس از اضافه کردن هر جزء لازم است spin کوتاهی انجام گیرد تا مخلوط واکنش در انتهای تیوپ جمع شود.
6. شرایط انکوباتور به شرح زیر است.

| primers | Reaction temperature | Incubation time |
|---|---|---|
| Oligo dT or Gene-specific primer | 42-60°C<br>Recommend 55°C | 30-60 min |
| | 25°C | 5min |
| Random hexamer | 42-60°C<br>Recommend 55°C | 30-60 min |

7. جهت خاتمه دادن واکنش باید نمونه ها را تحت دمای 85°C به‌مدت 5 دقیقه انکوبه کرد. (سرما توسط یخ)

8. جهت حذف RNA باقی مانده مکمل cDNA با اضافه کردن 1- 2 یونیت RNase H و سپس قرار دادن تحت دمای 37°C به‌مدت 20 دقیقه. (این مرحله اختیاری است).

Pishgam Biotech Co.
Making Science Taste Better
تهران، خیابان کارگر شمالی، تقاطع خیابان شهید فکوری، شماره ۲۸۹، ساختمان رز، واحد۷
تلفن:۸۸۰۱۴۳۹۳ دورنگار: ۸۸۰۱۴۴۱۸
www.pishgambc.com info@pishgambc.com