

# 4× EZscript Reverse Transcription Mix II (with gDNA Remover)

## 说明书

Cat. No.: EZB-RT2G

### 一、产品简介

本试剂盒为包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 的新一代快速逆转录试剂盒，与上一代产品相比具有更高的逆转录效率。试剂盒中主要包括四管试剂：gDNA Remover 试剂中包含浓缩的 DNase 及 Buffer；4× EZscript RT Mix II 试剂中包含逆转录所需的除引物以外的所有成分（逆转录酶、Buffer、RNase Inhibitor、dNTPs 等）；Oligo dT18 (20×)和 Random Hexamer (20×)这两种引物分别独立包装，便于添加目标片段特异性引物（如 microRNA, lncRNA, circRNA 等的特异性引物）。本试剂盒采用的 DNase 及 Buffer 反应系统经过特殊的优化，仅需室温（19~27°C）反应 5 min，就能降解 95% 以上的基因组 DNA，极大的降低了可能残留的基因组对结果的干扰。

本试剂盒采用的新型 M-MLV 突变体逆转录酶具有很强的抗干扰能力及扩增能力，扩增效率尤佳，同时采用了最新优化的反应体系，进一步提高了逆转录效率。使用本试剂盒逆转录 15 min 得到的扩增产物量可以达到 AMV 逆转录酶大约 1 h 的产物量（Ct 值相同）。后续逆转录产物建议用于 PCR、qPCR、基因克隆。

### 二、产品组分

组分	EZB-RT2G (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-RT2G-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
4× EZscript RT Mix II	550 µl	550 µl × 5 tubes
Oligo dT18 (20×)	110 µl	110 µl × 5 tubes
Random Hexamer (20×)	110 µl	110 µl × 5 tubes
gDNA Remover	220 µl	220 µl × 5 tubes
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml × 5 tubes

### 三、保存条件

本产品所有组分置于-20°C 保存，可保存 24 个月。

### 四、操作步骤

使用前将 gDNA Remover、4× EZscript RT Mix II、Oligo dT18 (20×)和 Random Hexamer (20×)或者目标片段特异性引物从-20°C 冰箱中取出，分别上下颠倒 5~10 次使之充分混匀（很重要），然后使用离心机短暂离心将管壁上附着的溶液甩下来，置于冰上待用。

#### 一、去除基因组 DNA 反应

1. 用 gDNA Remover 处理 RNA: 取 100 ng ~ 2 µg 的总 RNA（一般建议使用 1 µg 的总 RNA），加入 2 µl gDNA Remover，加 Nuclease free ddH<sub>2</sub>O 至 10 µl（如果所用 RNA 的浓度较低、体积很多，则无需补水），用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀，使用离心机短暂离心至管底，然后室温（19~27°C）反应 5 min，反应结束后置于冰上。

## 二、逆转录反应

2. 上述步骤反应结束后，按照如下体系配制逆转录反应体系，即向上述 gDNA Remover 处理过的总 RNA 中，加入 5  $\mu$ l 的 4 $\times$  EZscript RT Mix II、1  $\mu$ l 的目标片段特异性引物 (2  $\mu$ M) 或 Oligo dT18 或 Random Hexamer (后续实验为 qPCR 时，建议 Oligo dT18 和 Random Hexamer 各加 1 $\mu$ l; 后续实验为基因克隆时，则逆转录引物只需使用 Oligo dT18，且逆转录反应条件为 42 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 95 $^{\circ}$ C 反应 30 sec)，然后加入 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ l:

成分	体积 (20 $\mu$ l 体系)
gDNA Remover 处理过的总 RNA	上述体积 (X $\mu$ l)
4 $\times$ EZscript RT Mix II	5 $\mu$ l
A: 目标片段特异性引物 (2 $\mu$ M), 或	1 $\mu$ l
B: Oligo dT18/ Random Hexamer (20 $\times$ , 试剂盒附带)【注: A 与 B 不可同时添加】	各 1 $\mu$ l
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	补足到 20 $\mu$ l

3. 按照上表加好试剂后，必须用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀 (很重要，混匀时建议将移液器刻度调到 18  $\mu$ l 左右)，然后短暂离心至管底。
4. 逆转录反应条件: 42 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 95 $^{\circ}$ C 反应 30 sec; 逆转录反应结束后得到的产物即为 cDNA。
5. 逆转录反应得到的 cDNA 可直接作为模板进行 qPCR 反应，或者稀释 5~10 倍后再使用 (具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定)。在 20  $\mu$ l 的 qPCR 反应体系中: 如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4  $\mu$ l 的 cDNA (0.2~0.8  $\mu$ l); 如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2  $\mu$ l 的 cDNA (1~4  $\mu$ l); 如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4  $\mu$ l 的 cDNA (2~8  $\mu$ l)。如不立即进行 qPCR 实验，建议将 cDNA 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。