

# Color Reverse Transcription Kit (with gDNA Remover)

## 说明书

Cat. No.: A0010CG

### 一、产品简介

本试剂盒为一款包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 和高稳定性蓝色染料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× RT Master Mix 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）；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。

本试剂盒中的 4× RT Master Mix 含有高稳定性蓝色染料，在加样时提供了很好的视觉辅助，可以避免加样错误；它可与 EZBioscience® Color SYBR Green qPCR Mix (A0012, A0012-R1, A0012-R2) 一起使用，后者含有红色染料。qPCR 加样时，本试剂盒逆转录生成的 cDNA（蓝色），与 EZBioscience® Color SYBR Green qPCR Mix（红色）混合后，会使溶液变成紫色。并且这两种染料不影响 qPCR 反应的特异性和灵敏度。因此，建议将这两种试剂盒配套使用以获得最佳效果。

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	A0010CG (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	A0010CG-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
gDNA Remover	220 µl	220 µl × 5 tubes
4× RT Master Mix	550 µl	550 µl × 5 tubes
Oligo dT18 (20×)	110 µl	110 µl × 5 tubes
Random Hexamer (20×)	110 µl	110 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× RT Master Mix、Oligo dT18 (20×)、Random Hexamer (20×)或者目标片段特异性引物从冰箱中取出，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 µl 的 4× RT Master Mix、1 µl 的目标片段特异性引物 (2 µM) 或 Oligo dT18 或 Random Hexamer (后续实验为 qPCR 时, 建议 Oligo dT18 和 Random Hexamer 各加 1µl; 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°C 反应 30 min, 95°C 反应 30 sec), 然后加入 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 µl:

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

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 µl 左右), 然后使用离心机短暂离心至管底。
4. 逆转录反应条件: 42°C 反应 15 min, 95°C 反应 30 sec; 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 µl qPCR 反应体系中: 如果模板 cDNA 不稀释, 建议使用 0.4 µl 的 cDNA (0.2~0.8 µl); 如果模板 cDNA 稀释 5 倍, 建议使用 2 µl 的 cDNA (1~4 µl); 如果模板 cDNA 稀释 10 倍, 建议使用 4 µl 的 cDNA (2~8 µl)。如不立即进行 qPCR 实验, 建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。