

EZscript All-in-one Reverse Transcription Kit (with DNase)

说明书

Cat. No.: RT3

一、产品简介

本试剂盒为一款基因组 DNA 去除与逆转录反应在一步进行的新一代快速逆转录试剂盒，与 **EZBioscience® 4× EZscript Reverse Transcription Mix II (with gDNA Remover)** (Cat. No.: EZB-RT2GQ)相比，不需要单独进行去除基因组 DNA 的反应，操作更简便，并可有效降低复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。试剂盒中主要包括 3 管试剂：Enzyme Mix 中含有 DNase、RNase Inhibitor 和逆转录酶；5× EZscript All-in-one RT Buffer 中含有 buffer、dNTPs、Oligo dT18 和 Random Hexamer 等；NC Buffer。

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，同时又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。

二、产品组分

组分	RT3 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	RT3-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
Enzyme Mix	200 µl	200 µl × 5 tubes
5× EZscript All-in-one RT Buffer	400 µl	400 µl × 5 tubes
NC Buffer	20 µl	20 µl × 5 tubes
Nuclease free ddH ₂ 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 5× EZscript All-in-one RT Buffer、Enzyme Mix、NC Buffer 从-20°C 冰箱中取出，充分融化后均上下颠倒 10 次左右使之充分混匀（很重要），短暂离心将管壁上附着的溶液甩下来，然后置于冰上待用。

1、配制反应体系

1A、按照如下表格配制反应体系（基因组 DNA 去除和逆转录同步反应体系），即取 100 ng ~ 2 µg 的总 RNA（一般建议使用 1 µg）或者 10 pg ~ 500 ng poly(A) mRNA（一般建议使用 200 ng），然后依次加入下表所示体积的 Enzyme Mix、Nuclease free ddH₂O、5× EZscript All-in-one RT Buffer，以达到最佳去除基因组 DNA 的效果：

成分	体积（20 µl 体系）
总 RNA or poly(A) mRNA	1 µg 200 ng
5× EZscript All-in-one RT Buffer	4 µl
Enzyme Mix	2 µl
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 µl

1B、(可选操作) 配制 No Reverse-Transcriptase Control 反应体系 (No Reverse-Transcriptase Control 是指无逆转录酶的逆转录阴性对照反应, 用于检测 RNA 模板中是否有基因组 DNA 的残留)。

按照如下表格配制反应体系, 即取 100 ng ~ 2 µg 的总 RNA (一般建议使用 1 µg) 或者 10 pg ~ 500 ng poly(A) mRNA (一般建议使用 200 ng), 加入 4 µl 的 5× EZscript All-in-one RT Buffer、1 µl 的 NC Buffer, 然后加入 Nuclease free ddH₂O 补足至 20 µl:

成分	体积 (20 µl 体系)
总 RNA or poly(A) mRNA	1 µg 200 ng
5× EZscript All-in-one RT Buffer	4 µl
NC Buffer	1 µl
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 µl

2、按照 1A 和 1B 步骤配制好反应体系后, 在进行逆转录反应前必须使之**充分混匀 (很重要)**, 建议将移液器量程调到 18 µl 左右且轻柔吹打 10 ~ 15 次。

3、反应条件: 42°C 反应 15 min, 95°C 反应 30 sec; 反应结束后得到的逆转录产物即为 cDNA。

4、逆转录反应得到的 cDNA 可直接作为模板进行 qPCR 反应, 但更建议稀释并充分混匀后再使用 (具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定, 一般稀释 5 ~ 10 倍即可)。在 20 µl 的 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); 如果模板 cDNA 稀释 20 倍, 建议使用 9.2 µl 的 cDNA。如若不立即进行 qPCR 实验, 建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。