

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

说明书

Cat. No.: RT3P

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且含高稳定性蓝色染料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-RT2G) 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 5 管试剂：Enzyme Mix 含有 DNase、RNase Inhibitor 和逆转录酶；5× EZscript All-in-one RT Buffer 含有 buffer、dNTPs 及蓝色染料等；NC Buffer；Oligo dT18 (20×) 和 Random Hexamer (20×)。Oligo dT18 和 Random Hexamer 这两种引物独立包装，便于根据需要添加目标片段特异性引物。

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 分钟得到的扩增产物量可以达到 AMV 逆转录酶大约 1 小时的产物量 (Ct 值相同)。后续逆转录产物建议用于 PCR、qPCR 和基因克隆。

二、产品组分

组分	RT3P (100 Rxns)	RT3P-L (500 Rxns)
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
Oligo dT18 (20×)	110 µl	110 µl × 5 tubes
Random Hexamer (20×)	110 µl	110 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、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，充分融化后均需上下颠倒 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、若用于 mRNA/circRNA/lncRNA 的逆转录反应：

(1) 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)，加入 4 µl 的 5× EZscript All-in-one RT Buffer、2 µl 的 Enzyme Mix、1 µl 的 Oligo dT18 (20×) 和 1 µl 的 Random Hexamer (20×)，然后加入 Nuclease free ddH₂O 补足至 20 µl：

成分	体积 (20 μ l 体系)
总 RNA or poly(A) mRNA	1 μ g 200 ng
5×EZscript All-in-one RT Buffer	4 μ l
Enzyme Mix	2 μ l
Oligo dT18 (20×)	1 μ l
Random Hexamer (20×)	1 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μ l

注：逆转录 circRNA 时，可不使用 Oligo dT18 (20×)。

(2) (可选操作) No Reverse-Transcriptase Control 反应

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 μ g 的总 RNA (一般建议使用 1 μ g) 或者 10 pg ~ 500 ng poly(A) mRNA (一般建议使用 200 ng)，加入 4 μ l 的 5×EZscript All-in-one RT Buffer、1 μ l 的 NC Buffer、1 μ l 的 Oligo dT18 (20×) 和 1 μ l 的 Random Hexamer (20×)，然后加入 Nuclease free ddH₂O 补足至 20 μ l:

成分	体积 (20 μ l 体系)
总 RNA or poly(A) mRNA	1 μ g 200 ng
5×EZscript All-in-one RT Buffer	4 μ l
NC Buffer	1 μ l
Oligo dT18 (20×)	1 μ l
Random Hexamer (20×)	1 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μ l

1B、若用于目标特异性基因的逆转录反应：

(1) 按照如下表格配制逆转录反应体系，即取 100 ng ~ 2 μ g 的总 RNA (一般建议使用 1 μ g)，加入 4 μ l 的 5×EZscript All-in-one RT Buffer、2 μ l 的 Enzyme Mix、1 μ l 的目标片段特异性引物(2 μ M)，然后加入 Nuclease free ddH₂O 补足至 20 μ l:

成分	体积 (20 μ l 体系)
总 RNA or poly(A) mRNA	1 μ g 200 ng
5×EZscript All-in-one RT Buffer	4 μ l
Enzyme Mix	2 μ l
目标片段特异性引物 (2 μ M)	1 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μ l

(2) (可选操作) No Reverse-Transcriptase Control 反应

按照如下表格配制反应体系，即取 100 ng ~ 2 μ g 的总 RNA (一般建议使用 1 μ g) 或者 10 pg ~ 500 ng poly(A) mRNA (一般建议使用 200 ng)，加入 4 μ l 的 5×EZscript All-in-one RT Buffer、1 μ l 的 NC Buffer、1 μ l 的目标片段特异性引物 (2 μ M)，然后加入 Nuclease free ddH₂O 补足至 20 μ l:

成分	体积 (20 μ l 体系)
总 RNA or poly(A) mRNA	1 μ g 200 ng
5×EZscript All-in-one RT Buffer	4 μ l
NC Buffer	1 μ l
目标片段特异性引物 (2 μ M)	1 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μ l

2、按照 1A 或者 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 μ l 左右且轻柔吹打 10 ~ 15 次。

3、逆转录反应条件：42°C 反应 15 分钟，95°C 反应 30 秒；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 μ l 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4 μ l 的 cDNA (0.2 ~ 0.8 μ l)；如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2 μ l 的 cDNA (1 ~ 4 μ l)；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4 μ l 的 cDNA (2 ~ 8 μ l)；如果模板 cDNA 稀释 20 倍，建议使用 9.2 μ l 的 cDNA。如若不立即进行 qPCR 实验，建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。