

Color Reverse Transcription Kit (with gDNA Remover)

说明书

Cat. No.: A0010CGQ

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。试剂盒中主要包括两管试剂：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所有成分（逆转录酶、buffer、RNase Inhibitor、dNTPs、Oligo dT18、Random Hexamer）。

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，不建议用于基因克隆。

二、产品组分

组分	A0010CGQ (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	A0010CGQ-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
gDNA Remover	220 µl	220 µl × 5 tubes
4× RT Master Mix	550 µl	550 µl × 5 tubes
ddH ₂ O (Nuclease ⁻)	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 从冰箱中取出，解冻后分别上下颠倒 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液体甩下来，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 ddH₂O (Nuclease⁻) 至 15 µl (RNA 最大体积为 13 µl), 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:

成分	体积 (20 µl 体系)
gDNA Remover 处理过的总 RNA	15 µl
4× RT Master Mix	5 µl

3. 按照上表加好试剂后, 必须 Vortex 10 sec 或用移液器轻柔吹打 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 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)。如不立即进行 qPCR 实验, 建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。