

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
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、Oligo dT18 (20×)、Random Hexamer (20×) 或者目标片段特异性引物从冰箱中取出，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 ddH₂O (Nuclease⁻) 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 1 µl；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 ddH₂O (Nuclease⁻) 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
ddH ₂ O (Nuclease ⁻)	补足到 20 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 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。