

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 2 管试剂: Enzyme Mix 中含有 DNase 和 RNase Inhibitor 等; 5× EZscript All-in-one RT Buffer 中含有 buffer、逆转录酶、dNTPs、Oligo dT18 和 Random Hexamer 等。

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
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。过期日期详见产品标签中的有效期信息。

四、操作步骤

使用前将 5× EZscript All-in-one RT Buffer 及 Enzyme Mix 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

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 50 ng），然后依次加入下表所示体积的 Enzyme Mix、

ddH₂O (Nuclease⁻)、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 50 ng
5× EZscript All-in-one RT Buffer	4 μl
Enzyme Mix	2 μl
ddH ₂ O (Nuclease ⁻)	补足到 20 μl

2. 配制好反应体系后，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），然后短暂离心至管底。

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 1 μl 的 cDNA (0.5 ~ 2 μl)；如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 5 μl 的 cDNA (2 ~ 9.2 μl)；如果模板 cDNA 稀释 10 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。