

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：gDNA Remover 中含有 DNase 和 buffer 等；5× RT Mix 中含有逆转录酶、RNase Inhibitor、buffer、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 \ 货号（规格）	RT3 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	RT3-L (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
gDNA Remover (原 Enzyme Mix)	200 µl	200 µl × 5 tubes
5× RT Mix (原 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℃ 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× RT Mix 及 gDNA Remover 从-20℃ 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 5× RT Mix、gDNA Remover、ddH₂O (Nuclease⁻)，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× RT Mix	4 µl
gDNA Remover	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 使之充分混匀（很重要），然后短暂离心至管底。如果用 96 或 384 孔 PCR 孔板进行逆转录：加样完成后，盖上封板膜并封紧，再用一块孔板架或培养孔板的塑料盖倒置压住封板膜，双手紧握两端，Vortex 30 sec，以使液体充分混匀，然后放入孔板离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至孔板底部。

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 μ l 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 1 ~ 2 μ l 的 cDNA；如果模板 cDNA 稀释 4 倍，建议使用 4 ~ 8 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。