

Color Reverse Transcription Kit (with gDNA Remover) 操作说明

Cat. No.: A0010CGQ

试剂盒简介

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 分钟，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 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，不建议用于基因克隆。

简要操作步骤

使用前将 gDNA Remover、4× RT Master Mix 从冰箱中取出，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，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 分钟，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 μ l 的 4 \times RT Master Mix，然后加入 ddH₂O 补足至 20 μ l:

成分	体积 (20 μ l 体系)
gDNA Remover 处理过的总 RNA	上述体积 (X μ l)
4 \times RT Master Mix	5 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μ l

3、按照上表加好试剂后，必须用移液器轻柔吹打 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 μ l 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 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟，95 $^{\circ}$ C 反应 30 秒；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 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)。如不立即进行 qPCR 实验，建议将 cDNA 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。