

## 4×预混型快速逆转录试剂盒

产品使用说明书 (Version 3.0)

**产品名称:** 4×预混型快速逆转录试剂盒

**英文名称:** 4×Reverse Transcription Master Mix

**货号规格:** UR32051 (100 Rxns×20μL)

**运输存储:** 冰袋运输, -20°C存储。

### 产品描述:

本试剂盒为包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 的快速逆转录试剂盒, 主要包括两种试剂:

1) gDNA Remover 试剂中包含浓缩的 DNase 及 buffer; 2) 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 等)。

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, 极大地降低了残留基因组对结果的干扰。

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, 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。

### 产品组分:

组分	规格
4× RT Master Mix	550 μL
gDNA Remover	220 μL
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	1 mL

### 产品使用:

使用前将gDNA Remover、4× RT Master Mix从冰箱中取出, 上下颠倒5 ~ 10次使之充分混匀, 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。

#### ➤ 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 (如需使RNA二级结构变性, 可将RNA在65°C下孵育5 min, 然后迅速冰上冷却)。

#### ➤ 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, 然后加入ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL:

成分	体积 (20 $\mu$ L 体系)
gDNA Remover 处理过的总 RNA	上述体积 (X $\mu$ L)
4 $\times$ RT Master Mix	5 $\mu$ L
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	补足到 20 $\mu$ L

- 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（注：混匀时建议将移液器刻度调到18  $\mu$ L左右），然后使用离心机短暂离心至管底。
- 逆转录反应条件：42 $^{\circ}$ C反应15分钟，95 $^{\circ}$ C反应30秒；逆转录反应结束后得到的产物即为cDNA。
- 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  $\mu$ L 的qPCR反应体系中：如果模板cDNA不稀释，建议使用0.4  $\mu$ L的cDNA (0.2 ~ 0.8  $\mu$ L)；如果模板cDNA稀释5倍，建议使用2  $\mu$ L的cDNA (1 ~ 4  $\mu$ L)；如果模板cDNA稀释10倍，建议使用4  $\mu$ L的cDNA (2 ~ 8  $\mu$ L)。如不立即进行qPCR实验，建议将cDNA冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

### 常见的注意事项、操作要点及优化方法：

- 实验开始前首先验证qPCR引物是否适用，标准与上述标准类似，主要观察扩增曲线与熔解曲线；
- 引物验证后应该分装为几份，防止污染或降解；
- RNA的质量及cDNA的质量对qPCR的结果具有很大的影响，应尽量保证RNA不降解。RNA提取后应尽快进行逆转录反应，避免反复冻融，或者多次逆转录反应。如果预计使用量较大，则可以一次多逆转录几管cDNA。如果条件允许，cDNA建议保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱。