

货号: HR202

### 产品概述

本试剂盒 4× RT Mix 中的 Reverse Transcriptase 是在 M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase 的基础上经过多位点突变得到的高效逆转录酶, 提高了对 RNA 模板的亲性和 cDNA 合成效率。试剂盒中配有高效的 DNase (gDNA Eraser), 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, 保证后续定量 PCR 检测结果的可靠性。4× RT Mix 中含有逆转录所需要的除引物以外的所有成分: Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、buffer; oligo dT18 和 Random Hexamer 为独立包装, 便于添加目标片段特异性引物 (如 microRNA, lncRNA, circRNA 等的特异性引物)。试剂盒中优化的缓冲液配方保证了预混液的高性能和稳定性, 同时可以失活 DNase, 提高了使用的方便性。使用本试剂盒得到的逆转录产物建议用于 PCR、qPCR 和基因克隆。

### 产品组分

组分	HR202-T(100 次)	HR202-S(100 次)	HR202(500 次)	HR202-L(1000 次)
gDNA Eraser	22 µl	220 µl	220 µl × 5 管	HR202 × 2
4× RT Mix*1	55 µl	550 µl	550 µl × 5 管	
Oligo dT18	11 µl	110 µl	110 µl × 5 管	
Random Hexamer	11 µl	110 µl	110 µl × 5 管	
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml	1 ml × 5 管	

\*1: 包含 Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、buffer

### 产品保存

本试剂盒建议置于 -20°C 冰箱中保存。

### 实验前准备

请在实验前准备灭过菌的或者 Nuclease free 的枪头、1.5 ml 的 EP 管或者 PCR 管; 请打好冰; 预约好 PCR 仪或者预热水浴锅/金属浴。

### 实验注意事项

- 1) RNA 的纯度和完整性都会影响 cDNA 产量和最终的定量 PCR 检测结果。因此要尽量使用可靠的 RNA 提取产品以保证 RNA 的质量, 同时在 RNA 制备和逆转录的整个过程中注意避免 RNA 酶污染。相应的措施包括: 戴一次性干净手套和口罩; 提取的 RNA 置于 -80°C 冰箱保存; 在操作过程中避免讲话等。
- 2) 使用前, 应将 4× RT Mix、gDNA Eraser、Oligo dT18 或者 Random Hexamer 使用合适量程的移液器或者上下颠倒使之充分混匀, 然后短暂离心收集至管底。由于 4× RT Mix、gDNA Eraser 这两种溶液中都含有高浓度的甘油, 粘度较大, 因此应使用量程合适的移液器缓慢吸取; 同时, 吸取时枪头不要插入液面过深, 以免枪头壁上粘附大量的溶液导致误差和损耗。
- 3) 吸取不同的样品、试剂以及分装时注意更换吸头, 防止污染。

### 操作步骤

本试剂盒主要包含两个步骤: 去除基因组 DNA 反应和逆转录反应; 一般逆转录反应体系为 20 µl; 4× RT Mix、gDNA Eraser、Target Specific primer 或 Oligo dT18、Random Hexamer 在使用前均需要上下颠倒混匀, 短暂离心至管底, 方可使用。

如果使用本试剂盒用于基因克隆实验, 则逆转录引物只需使用 Oligo dT18 这个引物, 且逆转录反应时间需延长至 30 min。

#### 1. 去除基因组 DNA 反应

- 1) 取 100 ng ~ 2 µg 总 RNA (一般建议用 1 µg 的总 RNA), 加入 2 µl gDNA Eraser, 用移液器轻柔吹打 5 ~ 10 次, 使之充分混匀 (很重要)。
- 2) 室温 (约 19 ~ 27°C) 反应 5 分钟, 置于冰上待用。

备注: 如果所用 RNA 的浓度较高、体积很少 (体积小于 3 µl), 则在加入 2 µl gDNA Eraser 后用 Nuclease free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 µl, 用移液器轻柔吹打 5 ~ 10 次充分混匀, 室温 (约 19 ~ 27°C) 反应 5 分钟后, 置于冰上待用。

#### 2. 逆转录反应

1a) 对于 microRNA、lncRNA、circRNA 的逆转录反应来说, 需根据目的序列设计基因特异性引物进行逆转录反应; 按照下表配制逆转录反应体系, 即向上述 gDNA Eraser 处理过的总 RNA 溶液中加入 5 µl 的 4× RT Mix、1 µl 的 100 nM Target Specific primer, 并加水补足至 20 µl:

成分	体系 (20 µl)
gDNA Eraser 处理过的总 RNA	X µl
4× RT Mix	5 µl
Target Specific primer(100 nM)	1 µl
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 µl

1b) 对于 mRNA 的逆转录反应来说, 需使用 Oligo dT18 和 Random Hexamer 这两个引物的混合液进行逆转录反应; 按照下表配制逆转录反应体系, 即向上述 gDNA Eraser 处理过的总 RNA 溶液中加入 5 µl 的 4× RT Mix、1 µl 的 Oligo dT18、1 µl 的 Random Hexamer, 并加水补足至 20 µl:

成分	体系 (20 µl)
gDNA Eraser 处理过的总 RNA	X µl
4× RT Mix	5 µl
Oligo dT18	1 µl
Random Hexamer	1 µl
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 µl

- 2) 加好上述混合液后用移液器吹打 8 ~ 10 次, 使之充分混匀; 这个步骤很关键, 因为 4× RT Mix 的甘油含量比较高, 所以必须充分混匀。
- 3) 逆转录反应条件: 42°C 反应 15 分钟。逆转录反应可以在 PCR 仪或者水浴锅或者金属浴中进行, 如若在水浴锅或者金属浴中进行逆转录反应, 须提前预热仪器, 且最好使用 1.5 ml 的 EP 管进行反应。
- 4) 逆转录结束后得到 20 µl 的 cDNA; 一般 cDNA 需要稀释 5 ~ 10 倍后才可作为模板进行 qPCR (即稀释到 100 ~ 200 µl。使用前必须用相应量程的移液器吹打混匀或者上下颠倒混匀, 短暂离心至管底即可使用); 如果 cDNA 不立即进行后续的 qPCR 实验, 建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中, 不建议置于 -20°C 冰箱中保存。
- 5) 20 µl qPCR 体系一般可用 4 µl 稀释后的 cDNA (可在 2 ~ 8 µl 之间调整)。qPCR 实验推荐使用货号为 HR100/HR101/HR102 的 qPCR 试剂, 以便做出最佳实验结果。