



RT-PCR Kit (With gDNase)

第一链合成试剂盒(去基因组)

一、产品规格

产品组成	BLGE169-01 (25rxn)	BLGE169-02 (100rxn)	BLGE169-03 (500rxn)
5xgDNA Buffer	50μl	200μl	5xBLGE169-02
RT Primer Mix	50μl	200μl	
RT Enzyme Mix	25μl	100μl	
10x RT Buffer	50μl	200μl	
RNase Free ddH ₂ O	1ml	2x1ml	

二、产品情况

RT-PCR Kit(With gDNase)第一链合成试剂盒包含了最新开发的逆转录酶和缓冲系统，可在提高cDNA合成效率的同时，快速去除基因组中DNA污染，以保证后续定量结果的稳定、可靠。本品广泛适用于动物、植物及微生物RNA的逆转录反应，反应产物可兼容染料法和探针法qPCR、cDNA文库构建、SAGE（基因表达连续分析）、引物延伸等多种实验方案，产品特色如下：

1. 逆转录效率高达 95%以上；
2. gDNase 组分可在 42°C 3min 内去除 gDNA，可避免 Total RNA 中基因组 DNA 的干扰；
3. RT Enzyme 增加了疏水 motif，具有更强的 RNA 亲和力和热稳定性，可在 42°C 15min 完成 cDNA 第一链的合成；
4. 通读常规与复杂模板，快速解读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板；
5. 对不同物种来源及杂质较多的 RNA 模板适用性高，可配合荧光定量检测产品提高灵敏度和稳定性。

三、储存运输

本品需使用干冰运输，-40~-20°C可保存一年。

四、注意事项

- (一) 高质量的 RNA 对于制备 cDNA 至关重要，实验前请用电泳验证 RNA 的完整性；实验全程请在冰上操作，以防 RNA 降解。
- (二) 对于二级结构很复杂的 RNA 模板，推荐使用变性步骤（模板 RNA 65°C 孵育 5min，

继而转移至冰上待下一步操作)。

(三) PCR 反应有非特异性扩增时, 可将逆转录温度升到 50°C。

(四) 根据实验需求可选用 Oligo-dT Primer 或 Gene Specific Primer, 引物使用量可选用

Oligo-dT Primer 50pmol/20 μ l 反应体系, Gene Specific Primer 5pmol/20 μ l 反应体系。

(五) 下列操作步骤适用于模板量为总 RNA \leq 2 μ g, 如大于 2 μ g 请按比例扩大反应体系。

五、实验流程

(一) 自备产品

RNase-free 1.5ml 离心管、0.2ml PCR 管、移液器及吸头、PCR 仪、冰或移动冰盒

(二) 实验准备

1. 设定模板 50ng-2 μ g 总 RNA 的 20 μ l 反应体系;
 2. 冰上解冻模板 RNA;
 3. 5 \times gDNA Buffer、RT Primer Mix、10 \times RT Buffer、RNase-Free ddH₂O 室温解冻后, 迅速置于冰上;
 4. 使用前将每种溶液振荡混匀, 并可快速离心收集液体;
- 注意:** 请于冰上完成以下实验步骤, 并为保证反应液配制的准确性, 建议先配制成 Mix, 然后再分装到每个反应管中。

(三) 去除基因组 DNA

1. 在 RNase-free 1.5ml 离心管中配制以下溶液 A:

5 \times gDNA Buffer	2 μ l
模板 RNA	Total RNA: 1pg ~1 μ g
RNase-Free ddH ₂ O	补足到 10 μ l

2. 快速离心混匀溶液, 置于 42°C 孵育 3min, 放于冰上待用。

(四) 逆转录体系配制

1. 在 RNase-free 1.5ml 离心管中配制以下溶液 B:

10 \times RT Buffer	2 μ l
RT Enzyme Mix	1 μ l
RT Primer Mix	2 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	补足到 10 μ l

2. 快速离心混匀溶液 B

3. 将溶液 B 加到溶液 A 中, 充分混匀。

(五) 进行逆转录反应

42°C	15min
95°C	3min

将反应产物 cDNA 置于冰上用于后续实验, 或低温保存。

六、常见问题及处理方案

低得率	A. RNA 模板中含有 RNase 酶，致使 RNA 降解、cDNA 产物量少或无； B. RNA 模板中含有蛋白、盐离子、EDTA、乙醇、酚等杂质，影响逆转录酶活性； C. 以上操作步骤适用于模板 RNA 量为 50ng-2 μ g；当模板量 \geq 2 μ g，请按比例扩大此反应体系。
后续实验	A. 若后续为实时荧光定量 PCR，逆转录产物的加入量应小于 PCR 体系终体积的 1/10； 如 100 μ l 的 PCR 反应体系，逆转录产物的加入量应不超过 10 μ l。
保存	A. 逆转录产物可置于冰上短暂保存，待后续实验； B. 如需要长期保存，请置于-20 $^{\circ}$ C。
