

M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover	10T	MF166-plus-T
M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover	100T	MF166- plus -01

【储存条件】

-20°C。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover 是在 MF166 基础上将去除基因组 DNA (gDNA) 酶和 buffer 进行了一管化处理, 专为两步法 RT-PCR 第一步实验设计的超高灵敏度 RT-PCR 反应系统, 可以从极低量的总 RNA 或 poly(A) mRNA 合成第一链 cDNA, 并能够通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板。通常通过柱纯化的 RNA 经常混入微量的 gDNA, 当检测目的基因中存在假基因或者无法横跨内含子设计引物时, 混入的 gDNA 会被当成模板扩增, 影响数据的准确性。本试剂盒增加了具有强力降解 DNA 的 gDNA 清除剂, 通过该组分将混入 RNA 的 gDNA 降解, 无需纯化即可对 RNA 进行反转录。另外, 本产品将引物配比、反转录酶和 RNase 抑制剂优化成 mix 形式, 精简了试剂盒组成, 非常简便操作, 而且对后续 Realtime PCR 反应体系影响也降到最低。

【产品特点】

- 1) 去除 gDNA: 只需 2 分钟, 就可以实现去除基因组 DNA 污染。
- 2) 方便快捷: mix 配制, 组分更少, 操作更快; 反转录只需 15min 就可以完成。
- 3) 超强对后续 qPCR 反应适用性: 通过组分和 Buffer 优化, 使带入到后续 qPCR 反应的反转录反应液的影响降到最低。
- 4) 高灵敏度: 对极少量的 RNA 模板也可以进行良好的反转录反应。

【产品组分】

	MF166-plus-T	MF166-plus-01
10x gDNA plus Remover Mix	10 µl	100 µl
5x M5 RT Super plus Mix*	40 µl	400 µl
DEPC-ddH ₂ O	0.5 ml	1.5 ml

* 5x M5 RT Super plus Mix: 由 M5 plus M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase inhibitors, Oligo dT primer, Random Primer, Buffer, dNTPs 等构成的 Mix 形式。打开盖子前, 请先离心, 使液体落在离心管底部后再使用。**另外, 本试剂粘度很高, 请小心使用移液器。**

【活性定义】

以 poly(rA)为模板, oligo(dT)为引物, 在 42°C 条件下, 10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 所需要的酶量定义为一个活性单位(U)。

【注意事项】

1. 实验过程中请全程注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂, 使用之前请完全溶解并充分混匀, 以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用, 因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用 M5 Total RNA Extraction Reagent (TRIgent) (货号 MF034-01 或者 MF736-01) 制备高质量的 RNA 模板, 并设置反转录反应阳性对照。
4. M5 M-MuLV RTase 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA, 其起始位点由所用引物所决定:

- 1) 随机引物 (Random Primer) 在 RNA 模板上没有特异性结合位点, 所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板;
 - 2) Oligo dT Primer 只能以 poly(A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板;
 - 3) 采用序列特异性引物 (Gene Specific Primer) 以其结合位点为起始位点。
5. M5 M-MuLV RTase 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
6. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板, 合成含各种标记的 cDNA, 作为杂交实验的探针。
7. RNA 可置于-70°C 以下长期保存, cDNA 合成产物可置于-20°C 保存。

【操作流程】

1. 根据以下表格在冰上配制反应体系, 总体积为 10 μ l。为了保证反应液配制的准确性, 先按反应数+2 的量配制预混体系, 然后再分装到每个反应管中, 最后加入 RNA:

10x gDNA plus remover mix	1 μ l
RNA 模板	0.01~1 μ g**
DEPC-ddH ₂ O	补足至 10 μ l

** 如果总 RNA 量大于 1 μ g, 请按比例扩大反应体系。

将反应液轻轻搅拌均匀, 短暂离心使管壁上的溶液收集到管底, 42°C 温育 2 分钟, 然后置于冰上冷却。

2. 接着反转录反应, 在冰上加入下列成分 (可根据需要, 扩大反应体系):

步骤 (1) 的反应液	10 μ l
5x M5 RT Super plus Mix	4 μ l
DEPC-ddH ₂ O	6 μ l
	20 μ l

3. 轻轻混匀, 短暂离心; 37°C 孵育, 15min; 85°C 加热 5 秒钟使酶失活; 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

注意: Realtime PCR 时, 作为模板直接稀释后添加 (添加到 PCR 反应液中的反转录稀释液, 尽量不要超过 20%, 以免导致 PCR 反应效率低下, 无法准确定量)。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。