

# M5 Sprint qPCR RT kit with gDNA remover

## “咪溜” 极速反转录试剂盒（含 gDNA 去除剂）

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Sprint qPCR RT kit with gDNA remover	10T	MF949-T
M5 Sprint qPCR RT kit with gDNA remover	100T	MF949-01

#### 【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 Sprint qPCR RT kit with gDNA remover 是在 MF166-plus 基础上采用了最新研制的耐高温(>50°C)，极速扩增的反转录酶，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（pg 级到 ug 级）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 5min 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】

	MF949-T	MF949-01
5x Sprint gDNA Remover Mix	20 µl	200 µl
5x M5 Sprint RT Mix*	40 µl	400 µl
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	0.5 ml	1.5 ml

\* 5x M5 Sprint RT Mix\*：由 M5 Sprint 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 Sprint 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 Sprint 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 $\mu$ 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：

5x Sprint gDNA Remover Mix	2 $\mu$ l
RNA 模板	0.01~1 $\mu$ g**
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	补足至 10 $\mu$ l

\*\* 如果总 RNA 量大于 1  $\mu$ 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 $\mu$ l
5x M5 Sprint RT Mix*	4 $\mu$ l
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
	20 $\mu$ l

3. 轻轻混匀，短暂离心；50°C 孵育，5min；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。