

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

产品名称	单位	货号
M5 Super qPCR RT kit with gDNA remover	50T	MF166-T
M5 Super qPCR RT kit with gDNA remover	200T	MF166-01
M5 Super qPCR RT kit with gDNA remover	2x200T	MF166-02

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。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 qPCR RT kit with gDNA remover 是在 MF012 基础上增加了去除基因组 DNA (gDNA) 功能，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 5 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；逆转录只需 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 反应的逆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-T	MF166-01	
gDNA remover	2.5 µl	10 µl	(液量非常少，使用前务必离心)
4x DNA remover Mix	110µl	440 µl	
5x M5 RT Super Mix*	100µl	400 µl	
5x M5 RT Super Mix Control**	10µl	40 µl	
DEPC-ddH ₂ O	0.5ml	2x1 ml	

最开始使用时，将 8.8 µl 的 gDNA remover 加入 4x DNA remover Mix (440 µl) 中，颠倒混匀，spindown 混匀后再使用，该混合物-20 度条件下至少可以保存 3 个月。如果短时间内无法使用完毕，请少量混合后使用（按比例减少）。

* 5x M5 RT Super Mix: 由 M5 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。

**5x M5 RT Super Mix Control: 该组分是 5x M5 RT Super Mix 去除了 M5 M-MuLV Reverse Transcriptase 的 mix，可以用于反转录的对照。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) 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】

(初次使用) 将 gDNA remover 与 4x DNA remover Mix 混合。

将 8.8 μl 的 gDNA remover 加入 4x DNA remover Mix (440 μl) 中，颠倒混匀，spindown 混匀后再使用，该混合物-20°C 条件下至少可以保存 3 个月。如果短时间内无法使用完毕，请少量混合后使用（按比例减少）。

1. RNA 通常具有复杂的二级结构，为了获得更高的合成效率，将 RNA 模板 65°C 孵育 5 分钟，以打开 RNA 的二级结构。
2. 然后立即放入冰浴 2min。
3. 去除基因组 DNA 的反应，在冰上加入下列成分（可根据需要，扩大反应体系）：

4x DNA remover Mix (含 gDNA remover)	2 μl
RNA 模板	0.01~0.5 μg
DEPC-ddH ₂ O	补足至 8 μl

将反应液轻轻搅拌均匀，37°C 温育 5 分钟。

4. 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 (3) 的反应液	8 μl
5x M5 RT Super Mix	2 μl
总共	10 μl

进行反转录阴性对照时，可用 5x M5 RT Super Mix Control 代替 5x M5 RT Super Mix，可以确认信号是否来自 cDNA。

5. 轻轻混匀，短暂离心；42°C 孵育，15-20min；50°C 孵育，5min（可选）。
6. 96°C 加热 5 分钟使酶失活；
7. 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。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。