

qRT SuperMix（含去除 gDNA 试剂）试剂盒说明书

产品概述

本品是利用 M-MLV 反转录酶的反转录试剂盒，cDNA 产物可直接用于 qPCR 检测。qRT SuperMix 中包含反转录反应所需的所有组分，并针对 Oligo dT(18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容染料嵌合法和探针法 qPCR 检测，能够进行高效的基因表达分析。在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的基因组 DNA (gDNA) 可直接作为反应的模板进行扩增，可能会造成实验结果的假阳性。本品中 gDNA Eraser Mix 可有效去除残留的基因组 DNA，确保定量结果的准确性，本品中配有 NRT Control Mix，可用于配制无反转录酶的阴性对照反应。

产品组成

试剂盒组成	FZ019-10	FZ019-100
gDNA Eraser Mix ^{*1}	24 μ L *1	240 μ L *1
5X qRT SuperMix ^{*2}	40 μ L *1	400 μ L *1
NRT Control Mix ^{*3}	8 μ L *1	80 μ L *1
RNase free water	1 mL *1	1 mL *2

*1: gDNA Eraser Mix 可搭配 5X qRT SuperMix 或 NRT Control Mix 使用。

*2: 该溶液含有 Evo M-MLV RTase、RNase Inhibitor、dNTPs、Oligo dT (18T) Primer 与 Random 6 mers Primer

*3: 该溶液不含 Evo M-MLV RTase，其余组分与 5X qRT SuperMix 完全相同

储存及运输条件

冰袋运输。**试剂置于-20 °C保存**，有效期 18 个月。

操作方法

1. 去基因组 DNA 与反转录反应

本产品有两种使用方法，可根据需求进行选择。操作如下：

● 方法一：All in one（去除 gDNA 与反转录反应同时进行）

当 RNA 质量较高（gDNA 残留少），或反应中 RNA 浓度较高、目标基因拷贝数较高时，可将去除 gDNA 与反转录合为一步操作。

按照下表配制反应液^{*1}、^{*2}，同时进行基因组 DNA 去除与反转录反应。

组分名称	20 μ L 体系
gDNA Eraser Mix	2 μ L
5X qRT SuperMix	4 μ L
Total RNA ^{*3}	-
RNase free water	up to 20 μ L

反应条件

步骤	温度	时间
1	37 °C	15 min
2	85 °C	5 sec
3	4 °C	Hold ^{*4}

*1: 反应体系可以根据需要调整，各组分按比例变更即可

*2: 配制试剂时，建议加样顺序按照 RNase free water、gDNA Eraser Mix、5X qRT SuperMix 依次添加，配制完成后用移液器轻柔吸打混匀，混匀后加入 RNA 模板。NRT Control 是指无反转录酶的阴性对照反应，可根据实际需要进行配制。配制时，将 5X qRT SuperMix 替换成 NRT Control Mix 即可



***3:** Total RNA 可根据需要添加, 提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20 μ L 反转录体系中, 使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 1 μ g; 使用探针法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 2 μ g。

***4:** 反应产物如立即用于后续 qPCR 反应, 可暂放于 4 $^{\circ}$ C 或冰上; 如短期保存建议放置于 -20 $^{\circ}$ C; 如长期保存建议放置于 -80 $^{\circ}$ C。

● **方法二: 两步法** (先去除 gDNA, 再进行反转录)

1.1 去除 gDNA

按照下表配制反应液^{*1, *2}, 进行基因组 DNA 去除反应。

组分名称	20 μ L 体系
gDNA Eraser Mix	2 μ L
Total RNA^{*3}	-
RNase free water	up to 16 μ L

反应条件

步骤	温度	时间
1	42 $^{\circ}$ C	2 min
2	4 $^{\circ}$ C	Hold ^{*4}

***1:** 反应体系可以根据需要调整, 各组分按比例变更即可

***2:** 配制试剂时, 建议先将 gDNA Eraser Mix 与 RNase free water 配制成预混液, 用移液器轻柔吸打混匀后, 再加入 RNA 模板。

***3:** Total RNA 可根据需要添加, 提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20 μ L 反转录体系中, 使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 1 μ g; 使用探针法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 2 μ g。

***4:** 反应产物取出后置于冰上, 立即进行后续反转录反应

1.2 反转录反应

配制反转录反应液^{*1}, 置于 PCR 仪进行反转录反应。

组分名称	20 μ L 体系
步骤 1. 去除 gDNA 反应液	16 μ L
5X qRT SuperMix^{*2}	4 μ L
Total	20 μ L

反应条件

步骤	温度	时间
1	37 $^{\circ}$ C	15 min ^{*2}
2	85 $^{\circ}$ C	5 sec ^{*3}
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

***1:** 反应体系可以根据需要调整, 各组分按比例变更即可。

***2:** NRT Control 是指无反转录酶的阴性对照反应, 可根据实际需要进行配制。配制时, 将 5X qRT SuperMix 替换成 NRT Control Mix 即可

***3:** 若反应产物立即用于后续 qPCR 反应, 可暂放于 4 $^{\circ}$ C 或冰上; 如短期保存建议放置于 -20 $^{\circ}$ C, 如需长期保存建议放置于 -80 $^{\circ}$ C。

2. 定量 PCR 分析

经上述反转录过程得到的 cDNA 可以直接进行定量 PCR 分析。推荐搭配本公司产品 **SYBR Green qPCR premix 试剂盒** 使用。



+86-18911183647



service@d-nano.cn



www.d-nano.cn

