天净沙系列

CAT#:220606

低温运输，-20℃保存

天净沙

除 gDNA RT 试剂盒

gDNA-free RT Kit

使用手册 V1.04

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

基因组 DNA（gDNA）污染是 RNA 样品中普遍存在的现象。由于污染的 gDNA 也会作为后续 PCR 的模板，因此会严重干扰后续 RT-PCR 的效率和准确性，尤其是定量 RT-PCR。目前的去 gDNA 污染的方法主要是用 RNase-free DNase 法降解 RNA 样品中的 gDNA，灭活 DNase 后，然后再进行 RT 反应。此方法分两步进行，十分不便。为了克服上述方法的缺点，本公司开发出了本产品，它具有下列特点：

1. 一管式去除 gDNA，跟 RT-PCR 反应的设置同步进行。
2. 高效，可以使样品中残留的 gDNA 污染（ng 级）降低到 PCR 检测不到的水平。
3. 跟 PCR 和荧光定量 PCR 兼容。
4. 本试剂盒所用的 MMLV 逆转录酶为 RNase H 缺失突变，故合成 cDNA 片段长度可达 12 kb。还能用于 GC 含量高，二级结构复杂的 RNA 模板。
5. 本产品规格足够 50 次 20 μL 体系的 RT 反应。
6. 本产品只用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
5×RT Buffer	220606a	200 μL	0.5 mL 绿盖管
抗污染 MMLV 逆转录酶	220606b	75 μL	0.5 mL 红盖管
专用 Oligo dT18 引物 0.5 μg/μL	220606c	50 μL	0.5 mL 白盖管
专用随机引物 0.2 μg/μL	220606d	50 μL	0.5 mL 黄盖管
dNTP 混合液 10 mM each	220864	20 μL	0.5 mL 蓝盖管
使用手册	220606sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

RNA 模板。

使用方法

1. 在一个干净的无 RNase 反应管中加入 RNA 模板，不超过 12 μL。

RNA 模板种类	加入量
总 RNA	100-500 ng
或 poly(A) mRNA	10-500 ng
或专一的 RNA	0.01 pg-500 ng

2. 加入 4 μL 5×RT Buffer。
3. 再加入 1.5 μL 抗污染 MMLV 逆转录酶。
4. 按下表加入引物：

引物种类	加入量

专用 Oligo dT18 引物 0.5 μg/μL	1 μL
或专用随机引物 0.2 μg/μL	1 μL
或 RNA 模板专一性引物	1 μL（20 pmol）
注意:随机引物与 RNA 模板的比例跟 cDNA 合成的平均长度成反比。	

5. 加入 1 μL 10 mM each 的 dNTP。加入引物和 dNTP 后必须马上进入后续操作，不要放置。
6. 最后补水使得总体积为 20 μL。
7. 37℃保温 10 分钟。
8. 对富含二级结构的高 GC RNA 模板，在 45℃继续保温 5 分钟。但如果使用本试剂盒提供的专用随机引物，由于其很短，则 45℃保温 5 分钟改成 25℃ 10 分钟以便其跟 RNA 结合。
9. 42℃逆转录 60 分钟。
10. 70℃保温 10 分钟以终止反应，然后放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。
11. 轻轻吹打混匀，短暂离心，37℃保温 60 分钟进行抗污染逆转录。
12. 95℃10 分钟加热灭活相关酶，短暂离心，直接作为模板用于后续常规 PCR、染料法 qPCR 或探针法 qPCR 实验，或者长期放-20℃待用。用于后续 PCR 时，一般使用量不超过终体积的 1/10，具体需要根据各厂家的 PCR 试剂盒确定。

关联产品	抗 DNA 污染 RT-PCR 试剂盒