

天
净
沙
系
列

CAT#:180403-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

同步式抗污染 RT 试剂盒

Synchronized Contamination-Resistant RT Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

基因组 DNA (gDNA) 污染是逆转录 (RT) 反应最常见的难题, 目前的去污染方法主要是 UTP-UNG 法和 RNase-free DNase 法。前者简单, 但成本高, 主要用于临床产品。后者必须把 gDNA 污染去除和 RT 反应两步分开进行, 不但繁琐, 还增加了第二次污染的几率。为了克服上述方法的缺点, 本公司开发出了本产品, 它与 UTP-UNG 法和 RNase-free DNase 法比较如下:

	UTP-UNG 法	DNase 法	本方法
可跟 RT 反应同步进行	是	否	是
可用常规 dNTP	否	是	是
跟古细菌 DNA 聚合酶 (如 Pfu) 兼容	否	是	是

此外, 本产品还有下列特点:

1. 同步式, 去除 gDNA 污染和 RT 同步完成, 比两步法操作更简单, 极大地减少了操作误差。
2. 方便, 各种 RT 成分都整合进了 RT Mix, 用户只需提供模板即可。
3. 去污染效率高, 对 ng 级 gDNA 污染 (在 20uL 体系中), 去除率达 99.9%。
4. 跟 PCR 和荧光定量 PCR 兼容, 且后续 PCR 可用 Pfu 等古细菌 DNA 聚合酶 (多为高保真酶), 而 UTP-UNG 法则跟其不兼容。
5. 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。
6. 本产品规格足够 50 次 20uL 体系的 RT 反应。
7. 本产品只用于科研。

规格及成分

成份	编号	十孔盒包装
2×抗污染 RT Mix	170403a	500 uL (白色盖)
抗污染 MMLV-RI 混合液	170403b	100 uL (红色盖)
RNase-free 水	80403	1 mL (本色盖)
使用手册	170403sc	1 份

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 有效期一年。

自备试剂

RNA 模板, PCR 试剂盒。

注意事项

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染, 防止 RNA 降解或实验中的交叉污染。
2. 使用之前请充分轻柔混匀各成分, 以防因盐离子浓度局部不均影响实验结果。
3. 本产品使用后应尽快放回 -20℃。

- 4. 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。
- 5. 操作人员请戴口罩和一次性手套，并经常更换手套。

使用方法

1. 确认 RNA 样品中是否有 DNA 污染（本试剂盒不提供相关试剂）。
一般来说，几乎所有总 RNA 提取样品中都有痕量的、电泳没法检测出来但 PCR 可以检测出来的 gDNA 污染。检测该类污染的方法是不经过 RT 反应、直接以 RNA 样品为模板进行 PCR。如果得到预期长度的条带，则表示 RNA 样品中有 gDNA 污染，必须使用抗 gDNA 污染的 RT 试剂或先去 gDNA 处理再进行 PCR。如果用 PCR 没有检测出 gDNA 的污染，则没有必要使用本产品，可以选用常规 RT 试剂。
2. 制备对照样品。建议在第一次使用本产品时设置对照以测试本产品的去污染效果。如果测试成功，则用一批次总 RNA 进行更多 RT 实验时就不需要再设置对照。制备对照步骤是：取 10uL 样品到一新塑料管，加入 1uL 自备的 DNase-free RNase A (2mg/mL) 并常温放置 30 分钟以降解 RNA，得到的无 RNA gDNA，下称对照样品。

注意：如果用户有根据 PCR 扩增产物长度大小来判断扩增是来源于 RNA 还是 gDNA 的方法，则不需制备对照样品，而是直接在 RT 反应结束后用一部分样品进行 gDNA 专一的 PCR 扩增，通过所得扩增产物大小来判断去污染效果。

3. 按下表设置 RT 反应 (20uL 体系):

成分	样品管	阳性对照	阴性对照
自备的总 RNA	50 ng-2 ug	-	
或自备的 mRNA 模板	5-200ng	-	
对照样品 (来于第 2 步)	-	(加入体积 同样品管)	(加入体积 同样品管)
抗污染 RT Mix, 2×	10 uL	10 uL	-
抗污染 MMLV-RI 混合液	2 uL	2 uL	-
补 RNase-Free 水	到 20 uL	到 20 uL	到 20 uL

注意：对于二级结构很复杂的 RNA 模板，推荐使用变性步骤，即在加入到上述反应体系之前，将模板 RNA 在 65°C 孵育 5 分钟后迅速转移到冰上放冷后再加样。如果样品太稀以致其加入量超过 8uL，则需要浓缩样品。

4. 轻轻混匀，短暂离心，上 PCR 机器，按下表参数进行 RT 反应:

步骤	参数

	37℃逆转录	37℃孵育 60 分钟
	50℃逆转录	50℃孵育 30 分钟 (见注)
	灭活逆转录酶	94℃加热 10 分钟
	保存	可-20℃长期保持或立即使用
	<p>注意: 对于二级结构复杂或者 GC 含量高的模板, 可增加此步以增强逆转录效率。对一般样品的 RT 反应, 此步可以跳过。</p> <p>5. PCR 扩增 (本试剂盒不提供相关试剂): 各取 5uL RT 产物作为模板用于 40uL 或以上的常规 PCR 或荧光定量 PCR。RT 反应液的使用量不要超过 PCR 反应体积的 20%。</p> <p>6. 结果分析。阴性对照中的 gDNA 污染没有去除, 故将有 gDNA 片段的扩增。阳性对照中的 gDNA 将被去除, 故不会有扩增。如果所得结果跟上述的结果不吻合, 则实验无效, 需要跟厂家联系。如果相吻合, 则无论样品管结果如何, 实验结果为有效。</p>	
关联产品	抗污染 RT-PCR 试剂盒 (两步法) (CAT#:180404)	