

天
净
沙
系
列

CAT#:190501-50
低温运输，-20℃保存

TIANDZ

去基因组 DNA 污染 RT 试剂盒

gDNA 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 RNA 样品中普遍存在的污染, 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 PCR 的效率和准确性, 尤其是定量 PCR。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, 并且需要加入 EDTA 来抑制 DNase 后才能进入 RT 步骤, 否则残留的 DNase 会降解 PCR 引物。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. 使用高效的基因组 DNA 去除剂, 可以在 2-5 分钟内去除 gDNA 污染到 PCR 检测不到的水平。并且去除 gDNA 污染后不需要终止试剂, 而常用的 DNase 清除法需要酶切 30 分钟以上, 还需要 EDTA 终止反应。 2. 去污染效率高, 对 ng 级 gDNA 污染 (在 20uL 体系中), 去除率达 99.9%。 3. 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 去污染法则跟其不兼容。 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 20uL 体系的 RT 反应。 6. 本产品只用于科研。			
规格及成分		成份	编号	十孔盒包装
		基因组 DNA 清除剂	190501a	50 uL (红色盖)
		10×基因组 DNA 清除剂缓冲液	190501b	100 uL (绿色盖)
		2×RT MagicMix	170403	500uL (白色盖)
		RNase-free 水	80403	1 mL (亮黄盖)
		使用手册	190501sc	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。			
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，则用一批次的自备总 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：如果用户有根据常规 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. 在离心管中按下表设置 RT 反应 (20uL 体系)： <table data-bbox="523 1120 1369 1503"> <tr> <th>成分</th><th>样品管</th></tr> <tr> <td>自备的总 RNA</td><td>50 ng-1 ug (不超过 7uL)</td></tr> <tr> <td>或自备的 mRNA 模板</td><td>5-100ng (不超过 7uL)</td></tr> <tr> <td>10×基因组 DNA 清除剂缓冲液</td><td>1 uL</td></tr> <tr> <td>基因组 DNA 清除剂</td><td>1 uL (粘稠，取用前离心)</td></tr> <tr> <td>补 RNase-Free 水</td><td>到 10 uL</td></tr> </table> 4. 轻轻吹打混匀，短暂离心，37℃保温 2-5 分钟。 5. 置冰上，加入 10uL 2×RT MagicMix，轻轻吹打混匀，短暂离心。如果 RNA 样品带有 polyA 尾巴 (真核生物 mRNA 有 polyA 尾巴)，则 42℃保温 15-30 分钟。如果 RNA 样品不带有 polyA 尾巴 (原核生物 mRNA 和病毒 RNA 一般都没有 polyA 尾巴)，则先 25℃保温 10 分钟，再 42℃保温 15-30 分钟。 6. 85℃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。	成分	样品管	自备的总 RNA	50 ng-1 ug (不超过 7uL)	或自备的 mRNA 模板	5-100ng (不超过 7uL)	10×基因组 DNA 清除剂缓冲液	1 uL	基因组 DNA 清除剂	1 uL (粘稠，取用前离心)	补 RNase-Free 水	到 10 uL
成分	样品管												
自备的总 RNA	50 ng-1 ug (不超过 7uL)												
或自备的 mRNA 模板	5-100ng (不超过 7uL)												
10×基因组 DNA 清除剂缓冲液	1 uL												
基因组 DNA 清除剂	1 uL (粘稠，取用前离心)												
补 RNase-Free 水	到 10 uL												
关联产品	抗基因组 DNA 污染 RT-PCR 试剂盒 (两步法) (CAT#:180404)												