

Livning Fast qPCR RT kit with gDNA remover (Livning 高效反转录试剂盒) 使用说明书

产品名称	单位	货号
Livning Fast qPCR RT kit with gDNA remover	10T	FM166PS
Livning Fast qPCR RT kit with gDNA remover	100T	FM166PM

【储存条件】

-20°C。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

Livning Fastq PCR RT kit with gDNA remover 是在 LMF166 基础上将去除基因组 DNA (gDNA) 酶和 buffer 进行了一管化处理, 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 2 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; 反转录只需 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】

	FM166P	FM166PM
10x gDNA Fast Remover Mix	S10 µl	100 µl
5x Livning RT FastMix*	40 µl	400 µl
DEPC-ddH ₂ O (无色)	0.5 ml	1.5 ml

* 5x Livning RT FastMix: 由 Livning Fast 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。

【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 Livning Total RNA Extraction Reagent (TRIgent) (货号 LV-MF034-01 或者 LV-MF736-01) 制备高质量的 RNA 模板, 并设置反转录反应阳性对照。
4. Livning 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. Livning 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】

- 1 根据以下表格在冰上配制反应体系, 总体积为 10 μ l。为了保证反应液配制的准确性, 先按反应数+2 的量配制预混体系, 然后再分装到每个反应管中, 最后加入RNA:

10x gDNA Fast remover mix	1 μ l
RNA 模板	0.01~1 μ g**
DEPC-ddH ₂ O	补足至 10 μ l

**** 如果总 RNA 量大于 1 μ g, 请按比例扩大反应体系.**

将反应液轻轻搅拌均匀, 短暂离心使管壁上的溶液收集到管底, 42°C 温育 2 分钟, 然后置于冰上冷却。

- 2 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 (1) 的反应液	10 μ l
5x Livning RT FastMix	4 μ l
DEPC-ddH ₂ O	6 μ l
	20 μ l

- 3 轻轻混匀, 短暂离心; 37°C 孵育, 15min; 85°C 加热 5 秒钟使酶失活; 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

注意: 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。