HotScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit (TwoStep gDNA Erase)

使 用 说 明 书

包 装 量：

目录编号	包装单位
RT316-01	50 次*20uL
RT316-02	100 次*20uL

Components	RT316-01	RT316-02
5× HotScript RT MasterMix II	200μL	400μL
4× gDNA Eraser Mix	200μL	400μL
5× No RTase Control Mix*	20μL	40μL
RNase-free Water	1mL	1mL

■ 5× No RTase Control Mix 和 5× HotScript RT MasterMix II 成分完全一致，只是不含 HotScript H⁻ RTase 反转录酶，可以用于反转录的阴性对照。

产品储存：4℃运输，-20℃保存，有效期 12 个月。

制品说明：

本产品是一种高效、稳定、快速并可以去除基因组DNA污染的高温反转录系统。试剂盒采用分子进化技术高达60℃的全新高温反转录酶，可以通读GC含量丰富，二级结构复杂的RNA模板，极大提高反转录效率。

本试剂盒为一管式反转录预混Mix，5× HotScript RT MasterMix II中含有反转录第一链合所需的所有试剂(HotScript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random Primer、Oligo(dT) Primer、dNTP Mixture、Buffer)。通常Real Time RT-PCR等实验需要先用DNase I消化去除RNA中残留的基因组DNA(gDNA)，但是传统DNase I 处理复杂并容易造成RNA的降解和损失。

本试剂盒中使用了具有DNA分解活性的特殊4× gDNA Eraser Mix，2分钟快速消除gDNA残留，不需要DNase消化和后续繁琐的实验步骤。

适用范围：第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测，尤其GC含量高，

复杂模板的高温反转录。

产品特点：

1. 新一代高温反转录酶极大提高包括复杂RNA模板的反转录效率，CT值一般提早2-3个循环。
2. 采用gDNA Eraser仅需2分钟清除DNA残留，不需要DNase消化和后续繁琐步骤。
3. 全预混的反转录Mix，只需加入RNA和水，15分钟简单快速完成反转录。
4. 同时2种Mix在-20℃不易冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单便捷。
5. 本产品针对qPCR进行特别优化oligo(dT)和N6随机引物配比，使cDNA合成可从RNA转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率，最大程度保证了qPCR结果的真实性和可重复性。

操作步骤：(以20μL反应体系为例，也可以采用10μL反应体系)

1. 将模板RNA和5× HotScript RT MasterMix II在冰上解冻；4× gDNA Eraser Mix和RNase-free Water在室温(15-25℃)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在RNase-free管里面加入以下成分：(建议使用PCR管冰上配制)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 12μL *
4× gDNA Eraser Mix	4μL(见注意事项 3)
RNase-free Water	to 16μL(补足到总体积 16μL)

■ **Total RNA不超过2μg，mRNA不超过200ng(20μL体系)**

3. 移液器轻轻吹打混匀，42℃孵育2分钟(或者37℃孵育5分钟)。控温步骤均建议PCR仪器上进行。
4. 继续直接在同一管加入如下成份：

Components	Volume
5× HotScript RT MasterMix II	4μL(见注意事项 3)

5. 移液器轻轻吹打混匀(总体积20μL)，25℃孵育10 min，50℃孵育15 min。
   注意：本制品在42℃-60℃反转录均有稳定良好效果。如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至55℃-60℃，有助于提高产量。
6. 85℃加热 5 sec 失活HotScript H⁻ RTase和gDNA Eraser。
7. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20℃保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70℃保存。cDNA应避免反复冻融。

RT-qPCR：取适量反转录cDNA产物(一般不超过qPCR反应体积的1/10)作为qPCR模板，

按照厂家荧光定量PCR试剂说明书进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。

注意事项：

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. 5× HotScript RT MasterMix II 和4× gDNA Eraser Mix非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5× HotScript RT MasterMix II和4× gDNA Eraser Mix内包含的酶均为过量，即使每次按照3.6μL-3.8μL使用，也不影响使用效果。
4. 可以不经过基因组去除步骤，直接用5× HotScript RT MasterMix II加RNA和水进行反转录，这样所得到的结果会与使用HotScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit(With SuperMix)/高温型反转录试剂盒(带预混合Mix) (货号：RT314)相当。

==========

扫码关注我们