

Evo M-MLV 反转录试剂盒 (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR)

Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR

Code No. AG11705

包装量: 100 rxns / 20 μ l
保存温度: -20 $^{\circ}$ C

产品概述

本制品是可以去除cDNA中混有的基因组DNA再进行Real-Time RT-PCR反应的专用试剂。基因组DNA会对cDNA的定量分析造成影响, 本制品使用了具有较强DNA分解活性的gDNA Clean Reagent, 通过42 $^{\circ}$ C 2 min即可除去基因组DNA。处理后的样品可以直接进行后续反转录反应合成cDNA, 再通过定量PCR进行基因分析。

使用本制品合成得到的cDNA适用于嵌合法和探针法qPCR分析。

保存

保存温度: -20 $^{\circ}$ C

运输温度: 干冰或者 -20 $^{\circ}$ C 冰袋

产品组成

gDNA Clean Reagent	100 μ l
5X gDNA Clean Buffer	200 μ l
Evo M-MLV RTase Enzyme Mix ^{*1}	100 μ l
5X RTase Reaction Buffer Mix ¹ 2	400 μ l
Oligo dT (18T) Primer (50 μ M)	100 μ l
Random 6 mers Primer (400 μ M)	100 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pcs

*1: 含有RNase Inhibitor。

*2: 含有dNTP。

注意事项

1. gDNA Clean Reagent 与 Evo M-MLV RTase Enzyme Mix甘油浓度较高, 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻轻吸打混匀, 过程中尽量避免起泡, 然后再进行使用。
2. 需要同时进行数次反应时, 应先配制各种试剂的混合液, 然后分装到每个反应管中。
3. 所有反应混合液需要在冰上配制。
4. cDNA产物适用于定量PCR反应, 不适用于长片段基因调取, 如有长片段扩增需要, 可使用Evo M-MLV RT for PCR Kit (Code. AG11603) 进行操作。

实验操作

使用本试剂盒进行反转录时主要包括2个步骤: 去除基因组DNA、反转录反应。

去除基因组DNA:

1) 按照下表内容配制好反应液, 进行基因组DNA去除反应;

组分名称	加入量
gDNA Clean Reagent	1 μ l
5X gDNA Clean Buffer	2 μ l
Total RNA ^{*1}	-
RNase free water	up to 10 μ l

反应条件: 42 °C 2 min
4 °C

*1: RNA量可根据需要添加。在20 μl反转录体系中, 使用 SYBR Green qPCR 法时, 建议最多使用1 μg total RNA; 使用探针法时, 建议最多使用2 μg total RNA。

反转录反应

2) 按照下表内容进行反应液配制, 进行反转录反应。

组分名称	加入量
步骤1反应液	10 μl
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix	1 μl
Oligo dT (18T) Primer (50 μM) *1	1 μl
Random 6 mers Primer (400 μM) **	1 μl
5X RTase Reaction Buffer Mix I	4 μl
RNase free water	3 μl
Total	20 μl ³

反应条件: 37 °C⁴ 15 min
85 °C 5 sec
4 °C

*1: 如果不使用引物混合物, 而选择单独引物, 引物使用量如下:

Oligo dT (18T) Primer——50 pmol / 20 μl反应体系

Gene Specific Primer——5 pmol / 20 μl反应体系

*2: 配制反转录反应时, 这几种溶液可以预先配制成Master Mix, 再分装10 μl到上述步骤1反应液中。如果不配制Master Mix, 向步骤1反应液中添加试剂时, 要先加入RNase free water、5X RTase Reaction Buffer Mix I, 混合均匀, 目的是使得 gDNA Clean Reagent 活性受到充分抑制, 之后再添加Primer、*Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix 溶液, 轻柔混匀后进行反转录反应。

*3: 反转录反应体系可以根据需要相应调整。

*4: 当使用Gene Specific Primer时, 可以将反应条件设置为42 °C 15 min; 如果为降低非特异性扩增, 可将反应温度升高到50 °C。

定量PCR反应

3) 从步骤2得到的反应液可直接用于后续定量PCR反应, 其加入量不要超过定量PCR反应体积的1/10 (V/V)。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.