



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)

产品编号	产品名称	包装
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次

产品简介:

- 碧云天生产的 BeyoRT™ II cDNA 合成试剂盒(with gDNA Eraser), 即 BeyoRT™ II First Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Eraser, 是一种能高效、稳定、快速去除基因组 DNA(genomic DNA, gDNA)污染, 并使用 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)用于以总 RNA、mRNA 等为模板反转录合成 cDNA 的试剂盒。
- 使用本试剂盒合成的第一链, 可以直接用于后续的常规 PCR、real-time PCR 也称定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)。
- 本试剂盒中含有的 gDNA Eraser, 能有效去除样品中的基因组 DNA(gDNA)污染, 从而使后续的 qPCR 结果更加准确。总 RNA 样品中加入 gDNA Eraser 在 37°C 孵育 2 分钟, 即可有效去除残留的 gDNA 污染, 从而可以有效避免总 RNA 中的 gDNA 对于后续 qPCR 定量的干扰。另一方面, 也有助于简化 qPCR 引物设计, 无需进行跨内含子引物设计。
- gDNA Eraser 不会干扰反转录和后续的常规 PCR 或定量 PCR。由于反转录缓冲液中含有抑制 gDNA Eraser 的成分, 经过 gDNA Eraser 处理后的 RNA 样品可以直接进行反转录反应以合成 cDNA。后续如果用于常规 PCR 或 qPCR, PCR 的首次变性条件能充分失活 gDNA Eraser, 因此不必担心 gDNA Eraser 对于后续的常规 PCR 或 qPCR 的干扰。
- 本试剂盒提供了高效的 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)。这是一种通过改造和优化的反转录酶, 无 RNase H 活性, 反转录效率高、热稳定性好、产物长度长。
- 本试剂盒中的 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)热稳定性高, 最适反应温度为 42-45°C, 但当温度达到 50°C 时仍具有很高活性, 且可获得较高产量的 cDNA。
- 用于体积为 20 微升的 cDNA 第一链合成反应时, 本试剂盒的不同包装足够分别进行 20, 100 或 500 个 RNA 样品的 gDNA 去除和 cDNA 第一链的合成。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7170S-1	5X gDNA Eraser Buffer	40μl
D7170S-2	5X RT Buffer	80μl
D7170S-3	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	40μl
D7170S-4	10X RT Primer Mix	40μl
D7170S-5	DEPC-treated Water	0.3ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7170M-1	5X gDNA Eraser Buffer	200μl
D7170M-2	5X RT Buffer	400μl
D7170M-3	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200μl
D7170M-4	10X RT Primer Mix	200μl
D7170M-5	DEPC-treated Water	1.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7170L-1	5X gDNA Eraser Buffer	1ml
D7170L-2	5X RT Buffer	2ml
D7170L-3	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	1ml
D7170L-4	10X RT Primer Mix	1ml
D7170L-5	DEPC-treated Water	7.5ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存。

注意事项：

- 对于GC含量比较高的RNA的反转录，产品的使用说明中给予了特别说明，请予以关注。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 去除 RNA 样品中的基因组 DNA。

- 将模板Total RNA，5X gDNA Eraser Buffer在冰上解冻，5X RT Buffer、10X RT Primer Mix、DEPC-treated Water在室温(15-25°C)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液混匀并短暂离心以使所有液体沉降于管底。
- RNA的变性(可选做)，把RNA样品在65°C条件下热变性5 min后，立即置于冰水中冷却。经过本步骤处理后，对于容易形成高级结构的RNA可以有效提高反转录的效率。初次实验时，建议对于是否需要变性进行摸索。注意：进行本步骤操作时，请不要添加gDNA Eraser Buffer。
- 按下表成分于冰上配制反应混合液，为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按照反应数+1的量配制Master Mix，然后再分装到每个反应管中，最后加入RNA样品。

试剂	使用量
5X gDNA Eraser Buffer	2µl
Total RNA	up to 1µg*
DEPC-treated Water	To 10µl
总体积	10µl

*常规的20µl反转录反应体系，可使用10pg到1µg的Total RNA，建议使用0.5-1µg的Total RNA。

- 在PCR仪上或水浴中，37°C孵育2min。迅速置于冰上放置。

2. 反转录反应

- 2X Master Mix 的配制：反应液配制请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+1 的量配制 Master Mix，然后分装 10µl 到每反应管中。轻柔混匀后立即进行反转录反应。按照下表的反转录反应体系配制混合液。如果经常进行反转录实验，为了方便操作，可以预先将 5X RT Buffer 和 10X RT Primer Mix 进行 2:1 混合，该混合液可在-20°C 稳定保存。

试剂	使用量
5X RT Buffer*	4µl
10X RT Primer Mix**	2µl
BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)**	2µl
DEPC-treated water	2µl
总体积(2X Master Mix)	10µl

*含 Mg²⁺和 dNTP。

**Oligo dT Primer 和 Random Hexamers 混合物。

***含 RNase Inhibitor。

- 将上一步骤配制好的 2X Master Mix，分装 10 µl 到步骤 1 所得的 10µl 反应产物中，充分混匀。
- 42°C 孵育 60 min 以进行反转录反应，随后 80°C 孵育 10 min 失活反转录酶后放于冰上。
注意：对于二级结构复杂或高 GC 含量的模板，可以提高反转录温度至 50°C，以增强反转录效率。
- 得到的 cDNA 可立即或-20°C 冻存后用于 qPCR、常规 PCR 等后续实验。-20°C 冻存的 cDNA 样品，通常宜在半年内使用；长期存放建议分装后在-80°C 保存。cDNA 宜避免过多的反复冻融。

常见问题：

- 总RNA反转录产物电泳观察不到。
反转录产物由于是从模板反转录而获得，而模板的量本身比较低，反转录的量通常还要少于模板量，并且总 RNA 的反转录产物大小很不均匀，因此通常总 RNA 的反转录产物直接电泳观察是观察不到的。
- 反转录产物通过PCR扩增没有特异性条带及qPCR检测无信号，或信号出现延迟
 - PCR扩增没有获得特异性条带时建议先使用actin、GAPDH等作为内参进行PCR扩增，看是否可以成功扩增。如果可以成功，则说明PCR扩增体系没有问题，此时通常是目的基因的引物设计欠佳，当然也有可能是反转录产物质量欠佳。如果内参不能被很好地扩增，则有可能PCR体系存在问题或反转录产物质量欠佳。
 - 模板RNA发生了降解。哺乳动物细胞或组织的总RNA琼脂糖电泳后应该可以看到清晰的18S和28S rRNA条带，并且28S rRNA和18S rRNA的亮度比例应该大于等于2.0。如果比例小于2.0，则提示总RNA发生了显著的降解，最好能重新制备总RNA样品。避免RNA降解的主要方法是，严格进行RNA的相关操作，包括带洁净手套、戴一次性口罩、在洁净环境中抽提或制备RNA，

以尽量避免RNase污染。

- c. 模板RNA的纯度偏低。在提取纯化RNA的过程中，残留在溶液中的一些成分如苯酚、SDS、EDTA、胍盐、磷酸、焦磷酸、多胺、亚精胺等会抑制反转录酶活性。对RNA样品进行柱纯化，或者进行沉淀、洗涤和再溶解，通常可以有效去除残留的污染物。通常选择使用碧云天的BeyoZol或Trizol抽提获得的总RNA完全可以满足反转录反应的需要。
- d. 反转录反应的模板量不足。在抽提获得总RNA后，在进行一些精细的定量检测时通常会进行DNase I消化，以充分去除可能的残留的DNA的干扰。DNase I进行热失活时，需要加入EDTA至终浓度为2.5mM，否则RNA在没有螯合剂的情况下，在加热过程中容易被水解，从而导致模板量不足。此外，扩增特定基因时，需要先查询该基因的组织分布特点，利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和PCR扩增，通常会由于模板量过少而PCR扩增失败。
- e. qPCR检测无信号或是信号出现延迟，有可能是由于配制反转录体系时，忘记添加某种试剂；使用了错误的反转录体系；qPCR体系中的反转录产物添加过多，并干扰了PCR反应，通常添加到PCR反应体系中的反转录反应产物最好能控制在10%以下，实际qPCR时的用量会更少。有些RNA模板富含GC或容易形成二级结构，此时可以考虑把反转录温度提高到45-50°C。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7153	BeyoRT™ M-MLV反转录酶	2000U
D7159	BeyoR™ M-MLV反转录酶(RNase H-)	2000U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU
D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7166	BeyoRT™ cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	10次
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次
D7172	cDNA第二链合成试剂盒	10次
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7226	GC-rich PCR Buffer (4种套装)	共2ml
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	100次
D7251-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7251-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	2000次
D7251-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	10000次
D7255-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	100次
D7255-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7255-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	2000次
D7255-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	10000次
D7259-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	100次
D7259-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次
D7259-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	2000次
D7259-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	10000次
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250µl

R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0102	RNase Inhibitor	2000U
ST036	DEPC	10g

使用本产品的文献：

1. Zhang ZZ,Zhang HZ,Zhang ZY.3D printed poly(ϵ -caprolactone) scaffolds function with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to repair load-bearing segmental bone defects. *Exp Ther Med*. 2019 Jan;17(1):79-90
2. Peng Y,Xing SN,Tang HY,Wang CD,Yi FP,Liu GL,Wu XM.Influence of glucose transporter 1 activity inhibition on neuroblastoma in vitro. *Gene*. 2019 Mar 20;689:11-17
3. Fenbo M,Xingyu X,Bin T.Strontium chondroitin sulfate/silk fibroin blend membrane containing microporous structure modulates macrophage responses for guided bone regeneration. *CARBOHYD POLYM*. 2019 Jun 1;213:266-275
4. Gu Y,Zhang J,Zhang X,Liang G,Xu T,Niu W.Three-dimensional Printed Mg-Doped β -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro. *Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jun 17;16(4):415-429
5. Deng Y,Ma F,Ruiz-Ortega LI,Peng Y,Tian Y,He W,Tang B.Fabrication of strontium Eucommia ulmoides polysaccharides and in vitro evaluation of their osteoimmunomodulatory property. *Int J Biol Macromol*. 2019 Nov 1;140:727-735.
6. Zhi-Yun Liu, Chun-Guang Zhao. miR-532-3p inhibits the progression of tongue squamous cell carcinoma by targeting podoplanin. *Chin Med J (Engl)*. 2021 Dec 8;134(24):2999-3008.
7. Jingjing Lu, Bingqi Zhu, Fangmei Zhou, Xinghong Ding, Chaodong Qian, Zhishan Ding, Xiaoqing Ye. Polysaccharides From the Aerial Parts of *Tetrastigma Hemsleyanum* Diels et Gilg Induce Bidirectional Immunity and Ameliorate LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 11;13:838873.
8. Panfeng Chen, Xiaoping Li, Xi Yu, Min Yang. Ginsenoside Rg1 Suppresses Non-Small-Cell Lung Cancer via MicroRNA-126-PI3K-AKT-mTOR Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022 Jul 1;2022:1244836.
9. Wendan He, Xianlong Xie, Chenxi Li, Huang Ding, Jishi Ye. Adenosine A2A Receptor Antagonist Improves Cognitive Impairment by Inhibiting Neuroinflammation and Excitatory Neurotoxicity in Chronic Periodontitis Mice. *Molecules*. 2022 Sep 23;27(19):6267.
10. Meng Yu, Weiyan Wang, Jingye Dang, Binghua Liu, Junling Xu, Jingjing Li, Yang Liu, Libo He, Yuling Ying, Jiaxiu Cai, Guohua Cheng, Ke Liu. Hydrogen sulfide protects retinal pigment epithelium cells against ferroptosis through the AMPK- and p62-dependent non-canonical NRF2-KEAP1 pathway. *Exp Cell Res*. 2023 Jan 1;422(1):113436.

Version 2024.03.12