

ABScript II RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录号: RK20403

规格: 10 RXN / 100 RXN (20 μ L/RXN)**产品组成:**

5X ABScript II RT Mix	RM21452
5X No RT Mix	RM21453
4X gDNA Remover Mix	RM21458
Nuclease-free H ₂ O	RM20214

产品概述

ABScript II Reverse Transcriptase 是经基因工程改造的 *M-MuLV* 逆转录酶, 降低了 RNase H 活性, 提高了热稳定性和 cDNA 合成效率, 保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。

ABScript II RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 是基于 ABScript II Reverse Transcriptase 开发的, 适用于两步法 RT-qPCR 检测。本产品中的 5X ABScript II RT Mix 中含有逆转录反应所需的所有试剂, 只需加入 RNA 模板和无酶水即可迅速进行反应, 操作简单。本产品中的 4X gDNA Remover Mix 可彻底去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA, 使定量结果更加准确。4X gDNA Remover Mix 和 5X ABScript II RT Mix 在 -20°C 存储时不会冻结, 方便取用。

本品针对 qPCR 进行特别优化, Oligo d(T)₂₃VN 比 Oligo d(T)₁₈ 对于含 Poly(A) 的 mRNA 锚定能力更强, 使得逆转录效率更高。按比例优化的 Random Primers/Oligo d(T)₂₃VN Primer Mix 使 cDNA 的合成可从 RNA 转录本各区域起始并具有相同逆转录效率, 最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。逆转录产物兼容 SYBR Green 和探针法 qPCR, 可以根据实验目的, 选择相应的试剂配合使用, 进行高性能的基因表达分析。

产品规格及组成

组分名称	规格	规格
	10 RXN	100 RXN
5X ABScript II RT Mix*	40 μ L	400 μ L
4X gDNA Remover Mix	40 μ L	400 μ L
5X No RT Mix**	20 μ L	40 μ L
Nuclease-free H ₂ O	1.25 mL	1.25 mL X 2

*, 注: 5X ABScript II RT Mix 包含 ABScript II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, dNTPs, Random Primers / Oligo (dT)₂₃VN Primer Mix 等。

** , 注: 5X No RT Mix 除了不含 ABScript II Reverse Transcriptase 外, 其余成分与 5X ABScript II RT Mix 相同, 用作 No RT 阴性对照。

保存温度: -20°C**注意事项**

- 本产品中 4X gDNA Remover Mix、5X ABScript II RT Mix、5X No RT Mix 粘度较高, 使用前请短暂离心收集到管底, 并轻轻吹打混匀后使用。
- 本产品中已加入了 Random Primer 和 Oligo dT Primer, 不能使用基因特异性引物。
- 使用本产品获得的逆转录产物(cDNA)仅适用于 qPCR 反应, 不适用于克隆等下游实验为长片段 PCR 扩增的反应。如有需要, 可使用 ABScript II cDNA First-Strand Synthesis Kit (ABclonal RK20400) 进行实验。
- 吸取试剂时注意更换枪头, 避免试剂污染。

操作说明**实验准备**

- 自备器材: 1.5 mL RNase-free EP 管、200 μ L RNase-free PCR 管、RNase-free 移液器吸头、移液器、PCR 仪 (及 qPCR 仪)、冰盒或冰。
- RNA: 完整高质量的 RNA 对于获得高质量的 cDNA 至关重要。实验前请检测 RNA 是否降解或污染。对于含有高 GC 或复杂二级结构的 RNA, 可以 65°C 5 min (然后迅速置于冰上) 预处理后, 再进行逆转录反应。
- 注意事项: cDNA (反转录反应后的反应液) 可直接作为 qPCR 反应的模板, 建议模板体积不超过 qPCR 反应体积的 1/10, 或使用 Nuclease-free H₂O 稀释 cDNA 后再加入反应体系。
- qPCR 试剂选择指南: 可选择 ABclonal SYBR Green qPCR 系列产品 (ABclonal RK21203 / RK21204 / RK21205 / RK21206 / RK21207, 根据仪器型号选择对应产品) 或者 ABclonal Probe qPCR 系列产品 (ABclonal RK21208 / RK21209 / RK21210) 进行后续实验。

实验流程

1. 基因组 DNA 去除

1.1 在 RNase-free 反应管中加入以下组分，用移液器吹打混匀，短暂离心：

组分	加入量
4X gDNA Remover Mix	4 μ L
Total RNA	1 pg-1 μ g*
Nuclease-free H ₂ O	补足至 16 μ L

*，注：根据实验要求，加入合适的 RNA 量。RNA 模板体积较大时，请确保 RNA 是溶于水而不是 TE Buffer 中，因为 TE Buffer 会抑制反应。

1.2 按以下程序进行孵育：

温度	时间
37°C	5 min
85°C	5 min
4°C	Hold

2. 逆转录反应 / 阴性对照反应

2.1 在第 1 步的反应管中直接加入 5X ABScript II RT Mix，用移液器吹打混匀，短暂离心：

组分	加入量
5X ABScript II RT Mix	4 μ L
第一步反应液	16 μ L

2.2 No RT Control 反应（可选）*

No RT Control 是指不加逆转录酶的阴性对照反应，用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

配制如下混合液，轻轻混匀，瞬时离心：

组分	加入量
5X No RT Mix	4 μ L
第一步反应液	16 μ L

*，注：No RT Control 反应不是必须的，它可以用来验证逆转录产品的 gDNA 去除效率，但在正常的实验流程中可以不进行该操作。

逆转录反应程序

温度	时间
25°C	5 min
42°C	15 min
85°C	5 s
4°C	Hold

此产物可立即用于后续 qPCR 反应，或放在 -20°C 保存，避免反复冻融。

3. qPCR 反应

以下是使用本产品进行逆转录后，选用 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (ABclonal RK21203) 试剂，在 StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher) 仪器上进行后续 qPCR 检测的过程（请根据仪器型号选择相应的 qPCR 产品，实验前请阅读仪器操作手册）。

qPCR 反应体系（以 20 μ L 为例）

组分	加入量
2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	10 μ L
cDNA (RT 反应液)	X μ L*
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Nuclease-free H ₂ O	补足到 20 μ L

*，注：建议 cDNA (RT 反应液) 加入量不超过 qPCR 反应体系总体积的 1/10，或使用 Nuclease-free H₂O 稀释 cDNA。

qPCR 反应程序（两步法）

步骤	温度	时间	循环数
Stage1	95°C	3 min	1 cycle
Stage2	95°C	5 s	40 cycles
	60°C	30 s	

Melt Curve（仪器自动设置）

4. 结果分析

反应结束后确认 qPCR 的扩增曲线和熔解曲线，制作标准曲线进行定量分析等。分析方法参见相应的仪器操作手册。

质量控制

- ◆ 所有组分检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及 RNase 残留。
- ◆ 功能检测：以 1 pg-1 μ g 大鼠组织总 RNA 为模板，RT-qPCR 检测基因表达。以 5 个数量级的模板量对数值对 Ct 值做标准曲线并计算扩增效率， $R^2 > 0.990$ ，扩增效率在 0.95-1.05 之间。在 1 μ g 大鼠组织总 RNA 中混入 100 ng 大鼠基因组 DNA，经 4X gDNA Remover Mix 处理后，进行两对质控引物的 RT-qPCR，No RT Control 的 Ct 值 > 35 。