

# ABScript III RT Master Mix

## for qPCR with gDNA Remover

目录: RK20429

规格: 20 RXN / 100 RXN (20  $\mu$ L/RXN)

### 产品组成:

5X ABScript III RT Mix	RM21478
20X gDNA Remover Mix	RM21479
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	RM20214

### 产品概述

ABScript III RT Master Mix for qPCR with gDNA remover 是一款高效、快捷的 cDNA 一链合成预混液, 适用于两步法 RT-qPCR 检测。本产品中的 5X ABScript III RT Mix 中含逆转录反应所需的所有相关试剂, 只需加入 RNA 模板和无酶水即可进行逆转录反应, 操作简单。预混液中的 ABScript III Reverse Transcriptase (ABclonal RK20408) 是基于 M-MuLV 开发的第三代逆转录酶, 降低了 RNase H 活性, 提高了热稳定性, 反应温度高达 55°C, 大幅提升了逆转录效率和对复杂模板 (大量二级结构或高 GC 比例) 的耐受性, 具有更高的特异性、更高的产量。本产品中 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。具有热敏感性, 可在高温条件下快速不可逆地失活, 因此仅需一次加样, 即可同管进行去除基因 DNA 污染与逆转录反应。本品针对 qPCR 进行特别优化, 按比例优化的 Random Primers/Oligo d(T)<sub>20</sub>VN Primer Mix 使 cDNA 的合成可从 RNA 转录本的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。

### 产品规格及组分:

组分	20 RXN (20 $\mu$ L / RXN)	100 RXN (20 $\mu$ L / RXN)
5X ABScript III RT Mix	80 $\mu$ L	400 $\mu$ L
20X gDNA Remover Mix	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	1.25 mL	1.25 mL X 2

\*\*注: 5X ABScript III RT Mix 包含 ABScript III Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, dNTPs, Random Primers / Oligo (dT)<sub>20</sub>VN Primer Mix 等。

### 保存条件

-20°C 保存

### 注意事项

- 使用 5X ABScript III RT Mix 时, 请充分融解, 混匀后使用, 避免强光直射。若同时需要配制多个 5X ABScript III RT Mix 反应时, 应提前配制好所需的工作液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。
- 分取之前请瞬时离心收集到管底后使用, 使用后立即放回 -20°C 冰箱保存。
- 反应液的配制和分装一定使用无污染的气枪头、Microtube, 尽量避免污染。
- 预混液中已经包含 Oligo(dT)<sub>20</sub>VN 和随机引物, 不仅适用于包含 Poly(A) 结构的真核生物 mRNA, 也适用于不含 Poly(A) 结构的原核生物 RNA、真核生物 rRNA 和 tRNA 等模板, 但不适用于 miRNA 等小 RNA 模板。

### 操作说明

#### 实验准备:

- 自备器材: 1.5 mL RNase-free EP 管、200  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>O 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) 进行后续实验。

## 实验流程

### 1. 逆转录反应

#### 1.1 逆转录反应体系/阴性对照体系

在冰上按下述推荐加入各组分到 RNase-free PCR 管中，混匀并瞬时离心：

组分	加入量
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ L
5X ABScript III RT Mix	4 $\mu$ L
20X gDNA Remover Mix	1 $\mu$ L
Total RNA	10pg -1 $\mu$ g*

\*，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 会抑制逆转录反应。

#### 1.2 逆转录反应条件

在 PCR 仪上按以下反应程序进行逆转录反应：

温度	时间
37°C	2 min
55°C	15 min
85°C	5 min
4°C	Hold

逆转录产物(RT 反应液)可立即进行后续 qPCR 反应，或置于 -20°C 保存并在半年内使用；长期存放建议分装后在 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

## 2. 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 StepOne Plus 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 $\mu$ L 为例)

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

\*，注：建议 cDNA (RT 反应液) 的加入量不超过 qPCR 反应体系总体积的 1/10 或使用 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 稀释 cDNA。

#### qPCR 反应程序 (两步法)

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	1
收集荧光信号	95°C	5 s	40
	60°C	30 s	

熔解曲线 (仪器自动设置)

## 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。