

ABScript II RT Master Mix for qPCR

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录号: RK20402

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
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 是适用于两步法 RT-qPCR 的逆转录试剂。5X ABScript II RT Mix 中含有逆转录反应所需的所有试剂 [ABScript II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, dNTPs, Random Primers / Oligo (dT)₂₃VN Primer Mix 和优化的反应液], 只需加入模板 RNA 和 Nuclease-free H₂O 即可迅速进行反应, 操作简单。RNA 模板的体积最多可加到总体积的 80%, 该产品非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录反应。5X ABScript II RT Mix 在 -20°C 存储时不会冻结, 方便取用。

本产品针对 qPCR 反应进行特别优化, Oligo d(T)₂₃VN 比 Oligo d(T)₁₈ 对于 Poly A mRNA 的锚定能力更强, 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 转录本的各个区域起始并具有相同的逆转录效率, 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
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 和优化的反应液。

**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 5X ABScript II RT Mix 及 5X No RT Mix 黏度较高, 在使用前请瞬时离心收集到管底, 用移液器轻轻吸打混匀后使用, 尽量避免起泡。
- 本产品中已经加入了 Random Primers 和 Oligo d(T)₂₃VN Primer, 如需使用 Specific Primer 进行反应, 则不能使用本产品, 推荐使用 ABScript II cDNA First-Strand Synthesis Kit (ABclonal RK20400)。
- 使用本产品获得的逆转录产物 (cDNA) 只适用于 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。
- 吸取试剂时请注意更换移液器吸头, 避免试剂污染。

操作说明

实验准备

- 自备器材: RNase-free 1.5 mL EP 管、RNase-free 200 μ L PCR 管、RNase-free 移液器吸头、移液器、PCR 仪 (qPCR 仪)、冰盒或冰。
- RNA: 完整的高质量 RNA (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 加热 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. 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 ₂ O	补足至 20 μ L
5X ABScript II RT Mix	4 μ L
Total RNA	1 pg -1 μ 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 是溶于水中而不是 TE Buffer 中，因为 TE 会抑制逆转录反应。

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，用于检查 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。在 RNase-free 离心管中配制如下反应体系，混匀并瞬时离心：

组分	加入量
Nuclease-free H ₂ O	补足至 20 μ L
5X No RT Mix	4 μ L
Total RNA	1 pg -1 μ 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 是溶于水中而不是 TE Buffer 中，因为 TE Buffer 会抑制逆转录反应。

1.2 逆转录反应条件

在 PCR 仪上按下述反应程序进行逆转录反应：

温度	时间
25°C	5 min
42°C	15 min
85°C	5 s
12°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 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
Nuclease-free H ₂ O	补足至 20 μ L
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

*，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 H₂O 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	1 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。

质量控制

- ◆ 所有组分均无核酸外切酶、核酸内切酶及 RNase 残留。
- ◆ 功能检测：以 1 pg-1 μ g 大鼠组织 Total RNA 为模板，RT-qPCR 检测基因表达。以 5 个数量级的模板量的对数值对 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。