

说明书

一管式 Qpcr 逆转录试剂盒(一步 gDNA 去除)

Script All In One RT UltraMix For Qpcr(gDNA Remover)

产品介绍

本试剂盒采用分子进化技术多点突变的新一代反转录酶，大幅度提高了热稳定性和反转录效率。5×Ultra RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix，含有反转录所需的所有试剂（Ultrascript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random primer、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer），只需加入模板 RNA 和水即可进行反应。使得 cDNA 的合成更加的方便快捷，特别适合 cDNA 合成以后的两步法 Real Time PCR 检测。通常 Real Time RT-PCR 等实验需要先用 DNase I 消化去除 RNA 中残留的基因组 DNA(gDNA)，但是传统 DNase I 处理复杂并容易造成 RNA 的降解和损失。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover，只需一步操作，即可同时完成基因组清除与逆转录反应，极大简化了操作步骤，避免了复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。

特点

- 新一代反转录酶大幅度提高了热稳定性和反转录效率。
- 全预混的反转录 Mix，只需一步同时加入 gDNA Remover、模板 RNA 和水，实现 cDNA 合成和去除基因组 DNA 同时进行。30 分钟简单快速完成反转录。
- RNA 模板的体积最多可加到总体积的 80%，非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录反应。
- 预混合 Mix 在 -20℃ 不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单。
- 本产品针对 qPCR 进行特别优化 oligo dT 和 N6 随机引物配比，使 cDNA 合成可从 RNA 转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率，最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。

储存事项

干冰运输，长时间储存请放置于 -20℃ 保存；有效期 12 个月。

注意事项

- △ 避免 RNase 污染。
- △ 为保证反转录成功建议高质量 RNA 样品。
- △ 5×Ultra RT MasterMix 和 gDNA Remover 含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请短暂离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。
- △ 5×Ultra RT MasterMix 和 gDNA Remover 内包含的酶均为过量，即使每次 5×Ultra RT MasterMix 按照 3.6 uL-3.8 uL 使用，gDNA Remover 按照 0.8 uL-0.9 uL 也不影响使用效果。

操作步骤

1. 第一链cDNA合成(以20 uL反应体系为例，也可以采用10 uL反应体系)

- (1) 将模板RNA、gDNA Remover、5×Ultra RT MasterMix在冰上解冻；RNase free H₂O在室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可短暂离心以收集残留在管壁的液体到管底。
- (2) 在PCR管里面加入以下成分：(建议使用PCR管配制，置PCR仪内反应)

Components	Volume
RNase free H ₂ O	to 20 uL (补足到总体积 20 uL)

5×Ultra RT MasterMix	4 uL
gDNA Remover	1 uL
模板 RNA	≤ 15 uL *

* 反应体系中投入的 RNA 中所残留的 DNA 总量不能超过 500ng,如果超过 500ng 建议增加 gDNA Remove 的用量到 2ul.

(3) 移液器轻轻吹打充分混匀按照如下程序进行反转录 (总体积20 uL)

Temperature	Duration
42°C	20min
82°C	2min

***注意:**

1.以上反转录程序适用于来源于真核细胞 (如人、动物、植物的组织细胞) 含有Poly(A)尾结构的mRNA模板。如使用mRNA模板是来源于原核细胞 (细菌) 或者病毒等不含Poly(A)尾结构, 推荐在反转录前添加25°C孵育10 min的步骤, 然后接后续反转录程序。可以确保N6随机引物的有效退火, 提高cDNA产量。

2.若反转录后进行普通PCR (克隆基因片段) 扩增, 42°C反转录时间延长到30-50 min。

3.如果模板具有复杂二级结构或高GC区域, 可尝试将反转录温度提高至50°C-55°C (先在42°C孵育5分钟以清除基因组DNA), 有助于提高产量或者成功率。

(4) 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应, 或在-20°C保存, 并在半年内使用; 长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

2. RT-qPCR

取适量反转录cDNA产物 (一般不超过qPCR反应体积的1/10) 作为qPCR模板, 进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富, 可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。



重要提示

产品用于: 仅供研究使用, 不适用于人或动物的体外诊断与治疗。

由于实验受多种因素影响具有不确定性, 本说明书操作说明仅供参考, 最终解释权归本公司所有。

警告! 产品对人体危害性未知, 请遵循操作说明。穿戴适当的防护眼镜、衣服和手套!

