

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1		规格-2	
		20	RXN	100	RXN
5X ABScript III RT Mix *	RM21478	80	μL	400	μL
20X gDNA Remover Mix	RM21479	20	μL	100	μL
Nuclease-free H ₂ O	RM20214	1.25	mL	2 × 1.25	mL

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

产品说明

本产品是一款高效、快捷的 cDNA 一键合成预混液, 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)₂₀VN 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。

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头、Microtube, 尽量避免污染。
- 预混液中已经包含 Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物, 不仅适用包含 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。

操作方法

实验准备

- 自备器材: 1.5 mL RNase-free EP 管、200 μL RNase-free PCR 管、RNase-free 移液器吸头、移液器、PCR 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。

实验流程

1. 逆转录反应体系

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
5X ABScript III RT Mix	4 μL
20X gDNA Remover Mix	1 μL
Total RNA	10 pg-1 μg *
Nuclease-free H ₂ O	补足至 20 μL

*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。

2. 逆转录反应条件

在 PCR 仪上按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。