

货号: R712-01

制品简介

ReScript™ II Reverse Transcriptase 是在 M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase 基础上通过分子进化技术多点突变的新一代反转录酶, 大幅度提高了稳定性和反转录效率。Rescript™ II RT SuperMix for qPCR(+gDNA Eraser)适用于两步法 qRT-PCR 检测。试剂盒中的 4× gDNA Eraser Mix 可去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA, 保证后续定量结果的准确性。5× ReScript™ II RT SuperMix II 中含有反转录第一链合成所需的所有组分 (Buffer, dNTP Mixture, ReScript™ II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Random 6 mers/Oligo (dT) Primer Mix), 加入模板 RNA 和水即可迅速进行反应, 同时终止 gDNA Eraser 作用, 保证 cDNA 的完整性。

本试剂盒针对 qPCR 进行 Random 6 mers/Oligo (dT) Primer 的比例优化, 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。反转录产物兼容 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。

制品组成及包装量

组分	R712-01 100 rxn (20 µl/rxn)
4× gDNA Eraser Mix	400 µl
5× ReScript™ II RT SuperMix II	400 µl
5× No RTase Control Mix*	40 µl
RNase free H ₂ O	2 × 1 ml

*除不含 ReScript™ II Reverse Transcriptase 外, 其余成分与 5× ReScript™ II RT SuperMix II 相同, 用于配制反转录阴性对照。

储存条件

-20°C保存。

适用范围

第一链 cDNA 合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的 qPCR 分析。

注意事项

1. 高质量的完整的 RNA 对于获得高质量的 cDNA 是至关重要的。实验前请用电泳验证 RNA 的完整性。
2. 建议 RNA 是溶于水而不是 TE 中, 因为 TE 中的 EDTA 会对反转录反应产生抑制。
3. 20 µl 反转录反应体系中, 建议 Total RNA 加入不超过 2 µg, mRNA 不超过 200 ng, 否则加入 RNA 量过高, 可能会超出后续 qPCR 的线性范围。
4. 4× gDNA Eraser Mix、5× ReScript™ II RT SuperMix II 和 5× No RTase Control Mix 含有高浓度的甘油, 粘度高, 在使用前请短暂离心收集到离心管底部, 并用移液枪轻轻吸打充分混匀后, 准确吸取, 并且不要使 Tip 插入液面过深, 否则会因 Tip 壁粘着造成损失。
5. 可以不经基因组去除步骤, 直接用 5× ReScript™ II RT SuperMix II 进行反转录, 这样所得到的结果会与使用 ReScript™ II RT SuperMix for qPCR (Nobelab#R711) 相当。但是请勿将 gDNA Eraser 与 R711 中的 5× ReScript™ II RT SuperMix 配套使用, 因其不含终止 gDNA Eraser 反应的成分, 会影响反转录和后续的 qPCR 实验。
6. cDNA 产物仅适用于 qPCR 反应, 如果下游实验进行基因克隆等长片段 PCR 扩增, 可使用 Rescript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Nobelab#R701) 进行操作。

操作步骤

准备 0.2 ml PCR 管、移液器及吸头、PCR 仪、冰或冰盒。

1、 残留基因组 DNA 去除

在 PCR 管中配制如下混合液

RNase free H ₂ O	To 16 μ l (补足到总体积 16 μ l)
RNA 模板	Total RNA < 2 μ g, mRNA < 200 ng
4 \times gDNA Eraser Mix	4 μ l

用移液器轻轻吹打混匀, 42°C 2 min。

2、 配制反转录反应体系

在第 1 步的反应管中继续加入 5 \times ReScript™ II RT SuperMix II

5 \times ReScript™ II RT SuperMix II	4 μ l
第 1 步的反应液	16 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

No RTase Control 反应 (可选)

No RTase Control 是指不加反转录酶的反转录阴性对照反应, 用于检验反转录体系中是否有基因组 DNA 残留。

在 PCR 管中配制如下混合液

5 \times No RTase Control Mix	4 μ l
第 1 步的反应液	16 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

3、 进行反转录反应

42°C*	15 min
85°C	5 min

*注意: (a) 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, 反应程序为: 25°C 10 min, 42°C 15 min, 85°C 5 min。 (b) 反转录温度推荐为 42°C, 对于高 GC 含量模板或者复杂二级结构模板, 可将反应温度提高至 50°C, 有助于提高产量。

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 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

RT-qPCR

取适量 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 作为模板使用。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

