

Script III All-in-one RT Mix With dsDNase (PerfectforqPCR)**产品简介:**

Script III All-in-one RT Mix With dsDNase 是 Script III RT Kit With gDNA Eraser 的升级版, 只需一步操作, 仅需 15 分钟就可以同时完成基因组清除与逆转录反应, 操作方便快捷, 逆转录产物兼容染料法和探针法 qPCR, 用于检测高拷贝或低拷贝基因。本品采用第三代高效逆转录酶和热敏型 dsDNase, 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逆转录效率, 最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。

其中 5 x All-in-one RT Mix 为一管式逆转录预混液, 含有逆转录所需的所有试剂 (Script III H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、RT Buffer)。

产品内容:

Components	U1013-50 50 rxns (20 µl/rxn)	U1014-100 100 rxns (20 µl/rxn)
5x All-in-one RT Mix	200 µl	400 µl
dsDNase	50 µl	100 µl
RNase free H2O	1.5ml	1.5ml

保存条件:

-20℃ 保存, 有效期 12 个月。

注意事项:

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证逆转录成功, 建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 20µl 逆转录反应体系建议加入不超过 1µg 的 Total RNA。如果目的基因的表达量非常低, 最多加入 5µg Total RNA, 否则, RNA 量过高, 可能会超出后续 qPCR 的线性范围
4. 本产品适用于包含 Ploy (A)结构的真核生物 mRNA 和不包含 Ploy (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。
5. 5x All-in-one RT Mix 和 dsDNase 含有高浓度甘油, 比较粘稠, 容易吸附在管壁和吸头外, 导致损失, 使用前请点甩离心后取用。5x All-in-one RT Mix 和 dsDNase 内包含的酶过量, 即使每次分别按照 3.8 µl、0.9 µl 使用, 也不影响使用效果。
6. 建议使用 0.2ml RNase-free PCR 管在冰上配制反应液, 并用 PCR 扩增仪精准控温。

第一连 cDNA 合成 (以 20 µl 反应体系为例)

重要提示: 操作前, 请将各组分轻轻弹混匀, 点甩离心后置冰上备用。

1. 反应体系的配制

于冰上, 在 PCR 管中, 加入以下组分:

Components	Volume
Total RNA / mRNA	50ng ~ 1µg / 5ng ~ 100ng
5x All-in-one RT Mix	4 µl
dsDNase	1 µl
RNase-free H2O	To 20 µl

用移液器轻轻吸打, 充分混匀, 点甩离心收集至管底。

2. 逆转录反应

① mRNA 模板来源于真核细胞(植物、动物), 含有 Poly(A)尾结构: 42°C 孵育 15min;

② mRNA 模板来源于原核细胞(细菌)、病毒, 不含 Poly(A)尾结构: 25°C 孵育 10min; 42°C 孵育 15 min。

注意: 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域, 设置反应程序: 42°C 孵育 2 min (去除 gDNA), 50°C 孵育 15 min (逆转录), 有助于提高产量。

3. 终止反应

85°C 加热 5 sec, 失活 RTase 和 gDNA Eraser。

逆转录产物可立即用于 qPCR 反应, 或保存于 -20°C, 并在半年内使用; 长期存放, 请分装后存于 -70°C。

qPCR

建议取 1~2µl cDNA 产物原液作为 20µl qPCR 反应体系的模板。如果基因表达量比较高, 请根据实际情况适当稀释 cDNA 模板后使用。

联系我们:

免费电话: 400-681-8582 021-64228065

传真: 021-64228066

联系电话: 13918187419

QQ: 1296725867

地址: 上海市松江区博安路 377 号立同国际商务 3019-3025 室

公众号



官网

