

BiomarkerScript III RT Master Mix for qPCR (One-Step gDNA Remover)

目录: RK02013

规格: 100 RXN (20 μ L/RXN)



◆ 产品介绍

BiomarkerScript III RT Master Mix for qPCR (One-Step gDNA Remover)是基于BiomarkerScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (目录号: RK02002) 而开发出来的一款高效、快捷的cDNA一链合成预混液。与BiomarkerScript II Reverse Transcriptase相比, BiomarkerScript III Reverse Transcriptase作为第三代逆转录酶, RNase H活性明显降低, 增强了与模板RNA的亲合力。且三代逆转录酶热稳定性显著提高, 反应温度高达55 $^{\circ}$ C, 适合具有复杂二级结构(或GC含量高)的RNA模板的逆转录。

预混液中的5 $\times$ BiomarkerScript III RT Master Mix中含有逆转录反应所需的所有相关试剂, 只需加入RNA模板和RNase-free H₂O即可进行逆转录反应, 操作简单。

试剂盒中的gDNA Remover Mix, 可高效去除 RNA模板中残留的基因组 DNA污染, 保证后续定量结果更加可靠。且gDNA Remover具有热敏性, 在高温条件下会快速失

活, 从而保证了cDNA的完整性。

该产品适用于两步法RT-qPCR检测, 针对qPCR实验进行特别优化, 按比例优化的Random Primers/Oligo d(T)₂₀ VN 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结果的准确性和可重复性。逆转录产物cDNA可进行后续的SYBR Green和探针法qPCR实验, 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。

◆ 产品组成

试剂盒组成	目录号	100 RXN (20 μ L/RXN)
5 $\times$ BiomarkerScript III RT Master Mix ^a	RM02115	400 μ L
20 $\times$ gDNA Remover Mix	RM02116	100 μ L
Nuclease-free H ₂ O	RM02110	1.25 mL $\times$ 2

a. 包含BiomarkerScript III Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、Random Primers、Oligo (dT)₂₀ VN primer mix。

◆ 运输与保存条件

运输方式: 低温运输。

保存方式: -20 $^{\circ}$ C避光保存, 本产品避免反复冻融。

◆ 注意事项

1. 试剂盒中的5 $\times$ BiomarkerScript III RT Master Mix、20 $\times$ gDNA Remover Mix含有高浓度甘油, 使用前请短暂离心, 并用移液枪轻轻吹打, 充分混匀后准确吸取。
2. 使用5 $\times$ BiomarkerScript III RT Master Mix时, 避免强光照射, 并注意避光保存。
3. cDNA产物仅适用于qPCR反应, 不适用于PCR扩增等下游实验。如有长片段PCR扩增需要, 建议选择BiomarkerScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (目录号: RK02002) 进行操作。
4. 预混液中已经包含Oligo(dT)₂₀ VN和随机引物, 适用于包含Poly(A)结构的真核生物mRNA、以及不含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。
5. 实验过程中请使用RNase-free的枪头和离心管, 尽量避免RNase污染。
6. 为保证反应的成功, 建议使用高质量的RNA模板。

◆ 自备试剂&器材

试剂: RNA模板。

器材: PCR仪器、1.5 mL RNase-free离心管、200 μ L RNase-free PCR管、移液器和枪头。

实验流程

1. 配制逆转录反应体系 (建议冰上配置反应体系)

组分	加入量 ^a (20 µL体系)	加入量 ^a (50 µL体系)
5×BiomarkerScript III RT Master Mix	4 µL	10 µL
20× gDNA Remover Mix	1 µL	2.5 µL
Total RNA ^b	10 pg~1 µg ^c (100 pg以上效果更佳)	
Nuclease-free H ₂ O	to 20 µL	to 50 µL

a. 选择20 µL还是50 µL的反应体系, 需要客户根据自己的需求来决定。

b. 在20 µL反应体系中, 如果加入RNA模板体积较大 (超过2 µL), 请确保RNA是溶于水而不是TE Buffer中, 因为TE会抑制gDNA去除和逆转录反应。

c. 建议在20/50 µL体系中, Total RNA 的投入量不超过1 µg。如果目的基因的表达丰度低, 最多投入5 µg Total RNA, 否则RNA投入量过高, 可能会超过后续定量 PCR的线性范围。

2. 基因组DNA去除&逆转录反应程序

序号	步骤	温度	时间
1	gDNA清除	37 °C	2 min
2	逆转录	55 °C	15 min
		85 °C	5 min
		4 °C	Hold

反应完全后, 逆转录产物cDNA (RT反应液)可立即进行后续qPCR反应, 或直接保存在-20 °C冰箱中并在半年内使用;若要长期保存, 建议分装在-80 °C冰箱中保存, 并避免cDNA反复冻融。

3. 实验结果分析

反应结束后, 逆转录产物cDNA可直接用于后续qPCR反应, qPCR试剂盒可选用Biomarker 2× SYBR Green Fast qPCR Mix (目录号: RK02001), 具体操作请详看说明书。