

ATGScript® RT mix for qPCR (+gDNA wiper)

R113

产品简介

ATGScript® Reverse Transcriptase 是在 M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase 基础上经过饱和和定点突变得到的全新逆转录酶。经过热点突变, ATGScript® Reverse Transcriptase 的错配率比 M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase 大幅降低, 提高了克隆的保真度和热稳定性。通过优势组合突变增强了其与模板的亲合力, 特别适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录。ATGScript® RT mix for qPCR (+gDNA wiper)适用于两步法 qRT-PCR 检测, 加入模板 RNA 和水即可迅速反应。产品中的 4 × gDNA wiper Mix 可彻底去除残留的基因组 DNA 污染, 保证后续定量结果更加可靠; 5 × ATGScript® RT Mix 中含有逆转录反应所需的所有组分, 同时终止 gDNA wiper 作用, 保证 cDNA 的完整性。本产品针对 qPCR 进行特别优化, 比例优化的 Random primers/Oligo dT primer mix, 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。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。

产品组成

组分	R113 (100 rxns) (20 µl/rxn)
RNase free ddH ₂ O	2 × 1 ml
5 × ATGScript® RT Mix* ¹	400 µl
5 × Control No RT Mix* ²	40 µl
4 × gDNA wiper Mix	400 µl

*1. 包含 ATGScript® Reverse Transcriptase、dNTP、RNasin、Random primers/Oligo dT primer mix。

*2. 除不含 ATGScript® Reverse Transcriptase 外, 其余成分与 5 × ATGScript® RT Mix 相同。

储存条件

-20°C 保存, 于 -20 ~ 0°C 运输。▲避免反复冻融。

质量控制

核酸外切酶残留检测:

20 U 本品和 0.6 µg λ-HindIII 在 74°C 下孵育 1 h, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测:

20 µl 反应体系, 10 U 本品和 1 µg λDNA, 37°C 温育 4 h, DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测:

20 U 本品和 1 µg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min, RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测:

50 μ l 体系中, 以 ddH₂O 为模板, 扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 染色, 无扩增条带。

功能检测:

以 1 μ g 总 RNA 为模板, Oligo (dT)₂₃VN 为引物, 42°C 反应 45 min。取 1/10 cDNA 产物进行 PCR 扩增 VIN 基因。琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 4.6 kb 条带。

实验方案

(1) 基因组 DNA 去除

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

组分	用量
RNase Free ddH ₂ O	to 16 μ l
4 \times gDNA wiper Mix	4 μ l
模板 RNA	Total RNA: 1 pg ~ 1 μ g

用移液器轻轻吹打混匀, 42°C 2 min。

(2) 配制逆转录反应体系

按下列条件配制:

组分	用量
5 \times ATGScript [®] RT Mix	4 μ l
第 1 步的反应液	16 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

No RT Control 反应 (可选)

No RT Control 是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应, 用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

组分	用量
5 \times Control No RT 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) 进行逆转录反应

组分	用量
50°C	15 min
85°C	2 min

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。

注意事项

1. 20 μ l 逆转录反应体系建议加入不超过 1 μ g 的 Total RNA。如果目的基因表达量非常低，最多加入 5 μ g Total RNA，否则加入 RNA 量过高，可能会超出后续定量 PCR 的线性范围。
2. 如果加入 RNA 模板体积较大 (如超过 2 μ l)，请确保 RNA 是溶于水中而不是 TE 中，因为 TE 中的 EDTA 会对逆转录反应产生抑制。
3. cDNA 产物仅适用于 qPCR 反应，不适用于克隆等下游实验的长片段 PCR 扩增。