

ABKscript RT MasterMix (OneStep gDNA Removal)

产品信息

产品组成	ABK0004M (100T)
5 × ABKbio RT MasterMix	400 μL
RNase free H ₂ O	1.5 mL
gDNA Remover	100 μL

产品存储

-20 °C

产品简介

本产品采用新一代反转录酶（分子进化技术多点突变技术，大幅度提高了热稳定性和反转录效率），预先混合反转录需要的组分（script H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer）成为一管式反转录预混Mix。反转加样过程只需加入模板RNA和水即可进行反应。本试剂盒中使用了具有DNA分解活性的特殊gDNA Remover，只需一步操作，即可同时完成基因组清除与逆转录反应，极大简化了操作步骤，避免了复杂加样过程造成的样品污染与RNA降解的风险。

适用范围

第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

产品特点

1. 新一代反转录酶大幅度提高了热稳定性和反转录效率。
2. 全预混的反转录Mix，只需一步同时加入gDNA Remover、模板RNA和水，实现cDNA 合成和去除基因组DNA同时进行。**15分钟**简单快速完成反转录。
3. RNA模板的体积最多可加到总体积的80%，本产品非常适合于低浓度RNA模板的逆转录反应。
4. 预混合Mix在-20°C不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单。
5. 本产品针对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反转录效率，最大程度保证了qPCR结果的真实性和可重复性。

实验步骤

第一链cDNA合成(以20 μ L反应体系为例，也可以采用10 μ L反应体系)

1. 将模板RNA、gDNA Remover、5 $\times$ ABKbio RT MasterMix 在冰上解冻；RNase free H₂O在室温（15-25 $^{\circ}$ C）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在RNase free管里面加入以下成分：(建议使用PCR管冰上配制，置PCR仪反应)

成分	体积
Total RNA/mRNA	$\leq 15 \mu\text{L}^*$
5 $\times$ ABKbio RT MasterMix	4 μL （见注意事项 3）
gDNA Remover	1 μL （见注意事项 3）
RNase free H ₂ O	to 20 μL （补足到总体积 20 μL ）

* Total RNA 不超过 2 μg ，mRNA 不超过 200 ng (20 μL 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀(总体积20 μ L)，42 $^{\circ}$ C孵育15 min。
如使用mRNA模板是来源于真核细胞（如人、小鼠的组织细胞）含有Poly(A)尾结构，42 $^{\circ}$ C孵育15 min。
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，25 $^{\circ}$ C孵育10 min，42 $^{\circ}$ C孵育15 min。
注意：如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至50 $^{\circ}$ C-55 $^{\circ}$ C（先在42 $^{\circ}$ C孵育2分钟以清除基因组DNA），有助于提高产量。
4. 85 $^{\circ}$ C加热 5 sec 失活 Script H⁻ RTase和gDNA Remover。
5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。

注意事项：

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. 5 $\times$ ABKbio RT MasterMix和gDNA Remover含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5 $\times$ ABKbio RT MasterMix 和gDNA Remover内包含的酶均为过量，即使每次5 $\times$ ABK RT MasterMix 按照3.6 μL -3.8 μL 使用，gDNA Remover按照0.8 μL -0.9 μL 也不影响使用效果。