

货号: R711-01

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 适用于两步法 qRT-PCR 检测。5× ReScript™ II RT SuperMix 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。

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	R711-01 100 rxn (20 μl/rxn)
5× ReScript™ II RT SuperMix	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 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. RNA 模板的体积最多可加到总体积的 80%, 非常适合于低浓度 RNA 模板的反转录反应。
4. 5× ReScript™ II RT SuperMix 在 -20°C 不会冻结, 使用方便。
5. 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。
6. 5× ReScript™ II RT SuperMix 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。
7. 如果在 qPCR 实验中发现 No RTase Control 的 CT 值与实验组相差 < 5, 则说明 RNA 模板有可能受到基因组 DNA 的污染。此时, 可选择 ReScript™ II RT SuperMix for qPCR (+gDNA Eraser) (Nobelab #R712-01), 以彻底消除基因组 DNA 的污染影响。
8. 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、 配制第一链 cDNA 合成反应液

在 PCR 管中配制如下混合液

RNase free H ₂ O	To 20 μ l (补足到总体积 20 μ l)
5 \times ReScript™ II RT SuperMix	4 μ l
RNA 模板	Total RNA < 2 μ g, mRNA < 200 ng

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

RNase free H ₂ O	To 20 μ l (补足到总体积 20 μ l)
5 \times No RTase Control Mix	4 μ l
RNA 模板	Total RNA < 2 μ g, mRNA < 200 ng

用移液器轻轻吹打混匀。

2、 进行反转录反应

42°C*	15 min
85°C	5 s

*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 s。(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。

