

产品概述

AcuGenix™ Neoscript 1st cDNA Synthesis Master Mix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒提供了所有用于cDNA第一链合成的试剂,适用于两步法qRT-PCR检测。本产品中4×gDNA Wiper Mix可彻底去除RNA模板中残留的基因组DNA,使定量结果更加准确,并可简化qPCR引物设计,无需跨内含子设计引物。本产品中5×AcuGenix™ Neoscript 1st cDNA Synthesis Master Mix for qPCR是一款高效、快捷的cDNA一链合成预混液,加入RNA模板和无酶水即可进行逆转录反应。使用本制品合成的cDNA适用于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。

试剂组成

组分	BR1D301-01 100T (20 μL/T)	BR1D301-02 500T (20 μL/T)
4×gDNA Wiper Mix	400 μL	5×400 μL
5×AcuGenix™ Neoscript 1st cDNA Synthesis Master Mix for qPCR ¹	400 μL	5×400 μL
5×No RT Control Mix ²	40 μL	5×40 μL
RNase-free ddH ₂ O	2×1mL	10×1mL

1. 本试剂含有抑制DNase活性的组分,经过4×gDNA Wiper Mix处理后的样品可以直接进行反转录反应合成cDNA,因此可迅速完成从基因组DNA去除到cDNA合成的全过程;本试剂包含了Random 6 mers、Oligo (dT)₁₈ Primer两种引物以及dNTPs,可以均匀合成各种cDNA;
2. 本试剂除不含Neoscript RTase外,其余成分与5×AcuGenix™ Neoscript 1st cDNA Synthesis Master Mix for qPCR相同,用于配制No RT对照反应。

保存条件

-20±5℃存储。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融,反复冻融可能使产品性能下降,如每次使用量较少,推荐小份分装使用。
3. 在进行长片段扩增时,为了防止cDNA结构被破坏,建议以70℃处理15 min为酶灭活条件。
4. RNase Inhibitor的加入能有效抑制提取的RNA模板中带入的核酸酶对RNA模板的降解作用。
5. 高纯度、完整的RNA模板对于逆转录高质量及完整的cDNA链非常关键。gDNA Wiper的加入,最大程度保障了qPCR检测结果的稳定性和可靠性。

逆转录反应体系配制

1. 体系配制(在冰上进行配制)。

试剂	加量
4×gDNA Wiper Mix	4 μL
Template RNA	10 pg-1 μg*
RNase-free ddH ₂ O	To 16 μL

*根据实验要求加入合适的RNA量。

2. 使用移液器吹打混匀后,42℃加热 2 min(可使用PCR仪控温)。

3. 在上述体系中加入以下组分, 至总体积为 20 μ L (在冰上进行配制), 轻轻混匀。

试剂	加量
5×AcuGenix™ Neoscript 1st cDNA Synthesis Master Mix for qPCR	4 μ L

4. 逆转录程序为: 50°C* 15 min; 85°C 5s。

*对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板, 可适当升高反应温度。

5. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应, 或置于-20°C保存。

qPCR 反应体系配制

以下是使用 AcuGenix™ Robustart qPCR Master Mix (Universal ROX) (货号: BR1E101) 在荧光定量 PCR 仪上进行后续 qPCR 检测的操作流程。如配套 BR1E102 或者宝锐其他 qPCR 产品使用, 请参考对应产品说明书。

试剂	加量
2×AcuGenix™ Robustart qPCR Master Mix (Universal ROX)	10 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
cDNA*	—
RNase-free ddH ₂ O	To 20 μ L

*建议使用 RNase-free H₂O 稀释 cDNA, 同时 cDNA 的加入量不超过 qPCR 反应体系总体积的 1/10。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
预变性 ¹	95℃	5 min	1
变性	95℃	10 s	40
*退火延伸 ²	55℃	40 s	
*熔解曲线分析 ³			

1. 预变性条件适合绝大多数扩增反应。

2. 超过 200 bp 时, 推荐延伸时间适当延长, 退火延伸的温度根据设计的引物 T_m 值进行调整。

3. 熔解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定。

4. *标注处设置信号采集。