

ToloScript All-in-one RT EasyMix for qPCR

#22107

Version 11.1.1

■ 产品简介

本试剂盒是 ToloScript RT EasyMix for qPCR (with 2-Step gDNA Erase-Out, #22106) 的升级版，将原来的两步法优化升级为一步法，可在同一管中同时进行基因组 DNA 去除和逆转录两个反应，操作简便，并可有效降低多步骤操作过程中造成的样品污染和 RNA 降解的风险。

本试剂盒中包含的新一代逆转录酶 ToloScript Reverse Transcriptase 可耐受高达 60℃ 的反应温度，适合具有复杂二级结构的 RNA 模板的逆转录。同时，配合热敏型 DNase 以及针对基因组去除与逆转录一步反应优化的最适缓冲体系，可适用于少量模板或低拷贝基因的逆转录。逆转录产物兼容染料法和探针法 qPCR，分别推荐 ToloBio 通用型 2 × Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal, #22204) 和 2 × Q3 probe qPCR Master Mix (Universal, #22205)，进行高性能的基因表达分析。

■ 产品组成

组分	22107 (100 rxns)
● 5 × All-in-one RT Buffer ^a	400 μL
● All-in-one Enzyme Mix ^b	100 μL
● All-in-one No RT Control Mix ^c	20 μL
○ RNase-free ddH ₂ O	2 × 1 mL

a. 包含逆转录和 gDNA 去除反应所需的 Random primers/Oligo (dT)20VN primer mix, dNTP, Buffer;

b. 包含逆转录和 gDNA 去除反应所需的 ToloScript Reverse Transcriptase, DNase, RNase Inhibitor;

c. 除不含 ToloScript Reverse Transcriptase 外，其余组分与 All-in-one Enzyme Mix 相同。

◆ 请务必将 All-in-one Enzyme Mix 和 All-in-one No RT Control Mix 置于冰上!

■ 保存条件

-20℃ 储存，≤ 0℃ 运输。

■ 实验流程

1. 反应体系

在冰上融化各试剂组分，并充分混匀，并在 RNase-free 离心管中配置如下体系：

组分	体积
5 × All-in-one RT Buffer	4 μL
All-in-one Enzyme Mix	1 μL
Template RNA	x μL (1 pg ~ 1 μg)
RNase-free ddH ₂ O	Up to 20 μL

◆ 请务必用移液器轻轻吹打 8 ~ 10 次至充分混匀，再短暂离心收集至管底。

No RT Control 反应体系（可选）：

No-RT Control Mix 用于配置无逆转录酶的对照，判断 qPCR 模板是否来自 cDNA。

组分	体积
5 × All-in-one RT Buffer	4 μ L
All-in-one No RT Control Mix	1 μ L
Template RNA	x μ L (1 pg ~ 1 μ g)
RNase-free ddH ₂ O	Up to 20 μ L

◆ 请务必用移液器轻轻吹打 8 ~ 10 次至充分混匀，再短暂离心收集至管底。

2. 反应程序

温度	时间
50°C	15 min
85°C	5 sec

◆ 如果模板有高 GC 序列或复杂二级结构，可先将逆转录体系 25°C 反应 5 min，再将反应温度提高至 60°C，有助于提高产量。

◆ 逆转录产物可立即用于 qPCR 反应，或于 -20°C 保存，并在半年内使用；长期存放则建议分装后于 -80°C 保存，避免 cDNA 反复冻融。

■ 注意事项

1. 所有操作均应在冰上进行，且操作过程应避免 RNase 污染。请保持实验区干净整洁；操作时请穿戴干净的手套、口罩，请使用 RNase-free 的枪头、离心管等耗材。
2. 在完成反应体系配制后，请务必进行混匀操作，否则会影响实验数据的稳定性。
3. 在 20 μ L 逆转录反应体系中建议加入不超过 1 μ g 的 total RNA。若目的基因的反转录产物量非常低，则可以最多加入 5 μ g total RNA。否则，如果加入 RNA 量过高，可能会超出后续 qPCR 的线性范围。
4. cDNA 产物可立即用于 qPCR 反应，或冻存于 -20°C，并可在半年内使用。如需长期存放，则建议将逆转录 cDNA 产物分装后冻存于 -80°C，cDNA 应避免反复冻融。
5. 用于 PCR 反应的 cDNA 产物体积建议不超过 PCR 反应体积的 1/10。建议使用 ToloBio 通用型 2 × Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal, #22204) 进行后续的荧光定量实验，该产品具有优异的扩增性能，能够实现低浓度模板的稳定扩增；内含特殊的 ROX Passive Reference Dye, 适用于所有型号的 qPCR 仪器。
6. 本产品仅作科研用途。