Owi Script Reverse Transcriptase UltraMix with gDNA CleanUp for qPCR

Manuel d'utilisation

Références : 258497

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT

CONDITIONNEMENT : 20 rxn / 100 rxn (20 µL/rxn)

STOCKAGE : -20°C

DURÉE DE CONSERVATION : un an à compter de la date de réception si stocké correctement

---

DESCRIPTION DU PRODUIT :

Owi Script Reverse Transcriptase UltraMix with gDNA CleanUp for qPCR est un Master Mix permettant la synthèse rapide et efficace d'un premier brin d'ADNc. Ce kit est adapté à la détection RT-qPCR en deux étapes.

Le 5X **Owi Script RT Mix** contient tous les réactifs nécessaires à la réaction de transcription inverse. Il suffit d'ajouter une matrice d'ARN et de l'eau exempte de DNase/RNase pour effectuer la réaction de transcription inverse. Le protocole est simple et rapide.

Owi Script Reverse Transcriptase contenue dans le Master Mix est une transcriptase inverse de nouvelle génération développée à partir de la transcriptase inverse M-MuLV. Elle présente une activité RNase H réduite et une stabilité thermique améliorée. La température de réaction peut atteindre **55°C**, ce qui améliore significativement l'efficacité de la transcription inverse et permet une meilleure prise en charge des ARN complexes (structures secondaires complexes ou riches en GC), avec une spécificité accrue et un rendement plus élevé.

Le **gDNA CleanUp UltraMix** présent dans ce produit permet d'éliminer complètement l'ADN génomique résiduel dans les échantillons d'ARN et rend les résultats quantitatifs plus précis. Le **gDNA CleanUp UltraMix** est thermosensible et peut être rapidement et irréversiblement inactivé par chauffage à haute température. Il suffit donc d'ajouter l'échantillon, et la réaction peut être réalisée dans le même tube, combinant l'élimination de l'ADN génomique et la transcription inverse de l'ARN.

L'ADNc obtenu est spécialement optimisé pour la qPCR. Le mélange d'amorces, contenant un équilibre optimisé entre des amorces aléatoires et des amorces Oligo $d(T)_{20}VN$, permet d'initier la synthèse de l'ADNc sur n'importe quelle région de la matrice d'ARN avec une efficacité de transcription inverse homogène, garantissant ainsi une grande fidélité et une excellente reproductibilité des résultats en qPCR.

Le produit de transcription inverse est compatible avec les méthodes de **qPCR en SYBR® Green** ainsi qu'avec les sondes. Selon l'objectif de l'expérience, les réactifs de qPCR peuvent être sélectionnés pour assurer une analyse d'expression génique haute performance.

LISTE DES COMPOSANTS :

Composants	OZYA012-20	OZYA012-100
5X Owi Script RT UltraMix*	80 µL	400 µL
20X gDNA CleanUp UltraMix	20 µL	100 µL
Eau exempte de DNase/RNase	1,25 mL	2 x 1,25 mL

**5X Owi Script® RT UltraMix contient Owi Script® Reverse Transcriptase , un inhibiteur de RNase, dNTPs, des amorces aléatoires/oligo(dT)20VN Mix, etc.*

PRÉCAUTIONS :

1. Lors de l'utilisation du 5X **Owi Script** RT UltraMix, assurez-vous de le décongeler complètement et de bien le mélanger avant usage. Si plusieurs réactions doivent être préparées simultanément, il est recommandé de préparer le mélange réactionnel à l'avance, puis de l'aliquoter dans chaque tube de réaction afin de minimiser les pertes de réactifs.
2. Le 5X **Owi Script** RT UltraMix contient déjà des amorces aléatoires (Random Primers) et des amorces Oligo d(T), il n'est donc pas possible d'utiliser des amorces spécifiques à un gène.
3. Avant tout aliquotage, centrifugez brièvement le tube pour rassembler les réactifs au fond. Replacez immédiatement le tube au réfrigérateur à -20°C après utilisation.
4. L'utilisation de cônes de pipette et de microtubes stériles est essentielle pour la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Remplacez systématiquement les cônes de pipette lors du pipetage d'un nouveau réactif afin d'éviter toute contamination croisée.

PROTOCOLE STANDARD :

1. **Préparez le mélange réactionnel suivant sur de la glace** :
Ajoutez les composants dans un tube PCR exempt de DNase/RNase, en respectant les recommandations ci-dessous. Mélangez bien, puis effectuez une brève centrifugation :

Réactif	20 µL
5X Owi Script RT UltraMix	4 µL
20X gDNA CleanUp UltraMix	1 µL
ARN total	1 pg - 1 µg
Eau exempte de DNase/RNase	Compléter jusqu'à 20 µL

2. **Réglez la réaction RT** :

Température	Heure
37°C	2 min.
55°C	15 minutes
85°C	5 min.
4°C	Maintien

Remarque : L'ADNc (solution réactionnelle de RT) peut être utilisé immédiatement pour les réactions de qPCR ou stocké à **-20°C** et utilisé dans un délai de **six mois**.
Pour un stockage à long terme, il est recommandé d'**aliquoter** l'ADNc et de conserver les aliquots à **-80°C**. Il est préférable d'éviter les cycles répétés de congélation et décongélation de l'ADNc.

CONSIDÉRATIONS ET OPTIMISATIONS RT-QPCR :

Échantillons d'ARN :

Un ARN **complet et de haute qualité** est essentiel pour obtenir un ADNc de qualité. Assurez-vous que l'ARN n'est ni dégradé ni contaminé avant l'expérience. Si les molécules d'ARN présentent des structures secondaires complexes ou une forte teneur en GC, chauffez les échantillons d'ARN à **65°C pendant 5 minutes**, puis placez-les immédiatement sur de la glace avant la transcription inverse.

5X Owi Script RT UltraMix :

Le mélange RT contient déjà des amorces Oligo$(dT)_{20}$VN et des amorces aléatoires. Il est adapté à la transcription inverse des ARNm eucaryotes avec une queue poly(A), ainsi qu'aux ARN procaryotes, ARNr et ARNt eucaryotes sans queue poly(A). Cependant, il n'est pas adapté aux petits ARN, tels que les miRNA.

L’ADNc obtenu avec ce produit est exclusivement destiné aux réactions de qPCR et ne convient pas aux expériences impliquant une amplification de longs fragments, comme le clonage.

ADNc :

Les produits de transcription inverse (ADNc) peuvent être directement utilisés pour la qPCR. Il est recommandé que le volume d’ADNc non dilué ne dépasse pas 1/10 du volume total de la réaction de qPCR. Si nécessaire, diluer l’ADNc avec de l’eau exempte de nucléases avant son ajout à la réaction de qPCR.

Guide de sélection du mix qPCR :

Nous vous recommandons d'utiliser le **Owi Green Fast qPCR Premix** (OZYA008) pour la détection qPCR en SYBR Green®.

Tout Mix qPCR commercial pour la détection basée sur la technologie Sybr Green ou par sonde peut être utilisé après le **Owi Script Reverse Transcriptase UltraMix with gDNA CleanUp for qPCR** pour effectuer une qPCR en deux étapes.