

## 3) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25°C	5 min
42°C	60 min
70°C	15 min

产物可立即用于 qPCR 反应，建议作为模板的 cDNA 产物的体积不超过 qPCR 反应体积的1/10；短期存放建议在-20°C 保存，并在两个月内使用；长期存放建议分装后在-80°C保存；cDNA 应避免反复冻融。

## ● 注意事项

- 防止 RNase 污染。请保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase-free。
- 20 μL 逆转录反应体系建议加入不超过1 μg 的 Total RNA。如果目的基因表达量非常低，最多加入5 μg Total RNA，否则加入 RNA 量过高，可能会超出后续定量 PCR 的线性范围。
- 如果加入 RNA 模板体积较大 (如超过2 μL)，请确保 RNA 是溶于水中而不是 TE 中，因为 TE 中的 EDTA 会对逆转录反应产生抑制。



## First Strand cDNA Synthesis Kit

(+gDNA clearer)

货号：R412A/B

## ● 产品内容

组分	R412A	R412B
4× gDNA clearer	200μL	400 μL
10× RT Reaction Mix	100 μL	200 μL
PreScript II Enzyme Mix	100 μL	200 μL
Oligo (dT) <sub>23</sub> VN(50μM)	50 μL	100 μL
Random hexamers(50ng/μL)	50 μL	100 μL
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1 mL	1 mL

## ● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20°C保存。从-20°C取出使用时，将冻存的4×gDNA clearer、10×RT Reaction Mix、Oligo (dT)<sub>23</sub>VN、Random hexamers 融解，然后轻轻颠倒混匀后短暂离心至管底，轻弹混匀 Prescript II Enzyme Mix 并短暂离心至管底后置于冰上备用。

## ● 产品简介

本产品基于 PreScript II Reverse Transcriptase，包含合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分，适合于后续的 PCR、qPCR 以及 PCR 克隆。 $4\times$  gDNA clearer 可彻底去除残留的基因组 DNA 污染，保证后续结果更加可靠。10× RT Reaction Mix 包含优化的缓冲体系、dNTPs 和 gDNA clearer 终止成分，保证 cDNA 的完整性。PreScript II Enzyme Mix 包含 PreScript II Reverse Transcriptase 和 RNase Inhibitor。可根据需要，选择 Oligo (dT)<sub>23</sub>VN、Random hexamers 或基因特异引物作为逆转录引物。

PreScript II Reverse Transcriptase 是通过定点突变得到 RNase H 活性缺失的 M-MLV 突变体。与常见的通过删除 RNase H 结构域方法得到的突变体相比，本产品保留了完整的蛋白结构，因此具有与野生型相同的聚合酶活性，可用于较长的 cDNA 合成以及全长 cDNA 文库的构建等。

## ● 质量控制

- 所有组分经检测均无核酸外切酶，核酸内切酶，RNase 残留。
- 功能检测：以 1 pg-1  $\mu$ g HeLa 细胞总 RNA 为模板，qRT-PCR 检测高中低三种丰度共四个基因表达。以 5-6 个数量级的模板量的对数值对 CT 值做标准曲线并计算扩增效率， $R^2 > 0.990$ ，扩增效率在 0.9 到 1.1 之间。

## ● 操作方法

### 1. 后续实验为 PCR

#### 1) RNA 模板变性

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

RNase-free ddH <sub>2</sub> O	至 12 $\mu$ L
Oligo (dT) <sub>23</sub> VN (50 $\mu$ M)	
或 Random hexamers (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
或基因特异反转引物 (2 $\mu$ M)	
Total RNA or Poly A RNA	10 pg~5 $\mu$ g

用移液器轻轻吹打混匀并短暂离心，65°C 加热 5 min，迅速置于冰上骤冷，并在冰上静置至少 2 min。

#### 2) 基因组 DNA 去除

上一步混合液	12 $\mu$ L
4×gDNA clearer	4 $\mu$ L

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中 42°C 孵育 2 min，冰上冷却备用。

#### 3) 配制第一链 cDNA 合成反应液

上一步反应液	16 $\mu$ L
10×RT Reaction Mix	2 $\mu$ L
PreScript II Enzyme Mix	2 $\mu$ L

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后上机。

#### 4) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25°C	5 min
42°C	60 min
70°C	15 min

☆ 仅当使用 Random hexamers 时需要此步骤；使用 Oligo (dT)<sub>23</sub>VN 或 Gene Specific Primers 时省略此步骤。

产物可立即用于 PCR 反应，或在 -20°C 保存，并在两个月内使用；长期存放建议分装后在 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

## 2. 后续实验为 qPCR

#### 1) 基因组 DNA 去除

在 RNase-free 的 PCR 管中配制如下混合液

RNase-free ddH <sub>2</sub> O	至 14 $\mu$ L
4×gDNA clearer	4 $\mu$ L
模板 RNA	10 pg-5 $\mu$ g

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中 42°C 孵育 2 min，冰上冷却备用。

#### 2) 配制第一链 cDNA 合成反应液

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

上一步反应液	14 $\mu$ L
10×RT Reaction Mix	2 $\mu$ L
Oligo (dT) <sub>23</sub> VN (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Random hexamers (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
PreScript II Enzyme Mix	2 $\mu$ L

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后进行下一步反应。

