

3) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25°C	5 min
50°C	15 min
85°C	2 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。



Robust First Strand cDNA Synthesis Kit

(+gDNA clearer)

货号: R414A/B

● 产品内容

组分	R414A	R414B
4× gDNA clearer	200µL	400 µL
10× RT Reaction Mix	100 µL	200 µL
PreScript III Enzyme Mix	100 µL	200 µL
Oligo (dT) ₂₃ VN(50µM)	50 µL	100 µL
Random hexamers(50ng/µL)	50 µL	100 µL
RNase-free ddH ₂ 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)₂₃VN、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 III Enzyme Mix 并短暂离心至管底后置冰上备用。

● 产品简介

本产品基于 PreScript III 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×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 III Enzyme Mix 包含 PreScript III Reverse Transcriptase 和 RNase Inhibitor。可根据需要，选择 Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers 或基因特异引物作为逆转录引物。

PreScript III Reverse Transcriptase 是通过定点突变得到的 RNase H 活性缺失的全新逆转录酶，该酶的热稳定性和 cDNA 合成效率得到大幅提升，非常适合具有复杂二级结构的 RNA 模板的逆转录。

● 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 μg 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，R² >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 ₂ O	至 12μL
Oligo (dT) ₂₃ VN(50μM)	
或 Random hexamers (50ng/μL)	1μL
或基因特异反转引物(2μM)	
Total RNA or Poly A RNA	10pg~5μg

用移液器轻轻吹打混匀并短暂离心，65℃加热 5min，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	12μL
4×gDNA clearer	4μL

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中42℃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	16μL
10 × RT Reaction Mix	2μL
PreScript III Enzyme Mix	2μL

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℃★	5 min
50℃	30 min
85℃	2 min

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

产物可立即用于 PCR 反应，或在-20℃保存，并在两个月内使用；长期存放建议分装后在-80℃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 ₂ O	至14μL
4 × gDNA clearer	4μL
模板 RNA	10pg-5μg

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中42℃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	14μL
10×RT Reaction Mix	2μL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50μM)	1μL
Random hexamers (50ng/μL)	1μL
PreScript III Enzyme Mix	2μL

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后进行下一步反应。