

● 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 μ L 逆转录反应体系建议加入不超过1 μ g 的 Total RNA。如果目的基因表达量非常低，最多加入5 μ g 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 μ L），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。



PreScript III Reverse Transcriptase

货号：R415A/B

浓度：200U/ μ L

● 产品内容

组分	R415A	R415B
5 \times RT Reaction Buffer	500 μ L	1 mL
PreScript III Reverse Transcriptase	20 μ L	50 μ L

● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20 $^{\circ}$ C保存。从-20 $^{\circ}$ C取出使用时，将冻存的5 \times RT Reaction Buffer 融解，然后轻轻颠倒混匀后短暂离心至管底，轻弹混匀 PreScript III Reverse Transcriptase 并短暂离心至管底后置于冰上备用。

● 产品简介

野生型 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus)具有以下几种活性: 依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性; 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性; RNase H 活性。 由于 RNase H 活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA, 因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解模板 RNA。

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。

● 单位定义

以 Poly(rA)-Oligo(dT)为模板/引物, 在 37°C, 10 分钟条件下,掺入 1 nmol 的 dTTP 为酸不溶性物质所需要的酶量定义为 1 个活性单位(U)。

● 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 14μL
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°C加热 5min, 迅速置于冰上骤冷, 并在冰上静置至少 2 min。

2) 配制第一链 cDNA 合成反应液

上一步的混合液	14μL
5× RT Reaction Buffer	4μL
PreScript III Reverse Transcriptase	1μL
RNase inhibitor (40U/μL)	1μL

用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心后上机。

3) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25°C ☆	5 min
50°C	30 min
85°C	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°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) 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

Add RNase-free ddH ₂ O	To 20μL
5× RT Reaction Buffer	4μL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50μM)	1μL
Random hexamers (50ng/μL)	1μL
PreScript III Reverse Transcriptase	1μL
RNase inhibitor (40U/μL)	1μL
Total RNA or Poly A RNA	10pg~5μg

用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心后进行下一步反应。

2) 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。