

● 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。
- ❖ 请勿将4 $\times$ gDNA clearer 与其它 RT 试剂配套使用，因为产品所带的10 $\times$ RT Reaction Mix 含终止 gDNA clearer 反应的成分，其它试剂不含此成分，可能会影响后续的 qPCR 结果。
- ❖ cDNA 产物可直接用作 qPCR 反应的模板。建议作为模板的 cDNA 产物的体积不超过 qPCR 反应体积的1/10。

技术咨询: QQ/973107308

Tel/18927539098

Email/enzyvalley@163.com



Prescript II RT ProMix For qPCR (+gDNA clearer)

货号: R418A/B

● 产品内容

组分	R418A	R418B
4 $\times$ gDNA clearer	200 μ L	400 μ L
10 $\times$ RT Reaction Mix	100 μ L	200 μ L
Prescript II Enzyme Mix	100 μ L	200 μ L
RNase-free ddH ₂ O	1mL	1mL

● 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4 $\times$ gDNA clearer 和 10 $\times$ RT Reaction Mix 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

PreScript II Reverse Transcriptase 是通过定点突变得到的 RNase H 活性缺失的 M-MLV Reverse Transcriptase 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。PreScript II RT ProMix For qPCR (+gDNA clearer) 基于 PreScript II Reverse Transcriptase, 包含合成高质量 cDNA 所需的所有成分, 适合于两步法 RT-qPCR 检测。4×gDNA clearer 可彻底去除残留的基因组 DNA 污染, 保证后续定量结果更加可靠。10 × RT Reaction Mix 包含优化的缓冲体系、Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers、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。

本产品针对 qPCR 进行特别优化, 比例优化的 Random primers/Oligo (dT)₂₃VN primer mix, 可以在15min 内高效合成 qPCR 所用的模板 cDNA。

● 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, RT-qPCR 检测高中低三种丰度共四个基因表达。以5-7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。

● 实验前准备

- ❖ RNase-free 1.5 ml 离心管、0.2 ml PCR 管、移液器吸头
- ❖ 移液器; PCR 仪; 冰或移动冰盒
- ❖ 高质量的完整的 RNA。对于获得高质量的 cDNA 是至关重要的, 实验前请用电泳验证 RNA 的完整性。

● 操作方法

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16μL
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. 配制逆转录反应体系

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

上一步反应液	16μL
10× RT Reaction Mix	2μL
Prescript II 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。可选择设计 No RT Control 反应, No RT Control 是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应, 用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

3. 进行逆转录反应

25℃	5min
42℃	45min
70℃	15min

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℃ 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。