



PreScript II RT ProMix For qPCR

货号: R419A/B

- 产品内容

组分	R419A	R419B
2× RT Reaction Mix	500 μL	1 mL
PreScript II Enzyme Mix	100 μL	200 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2× 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 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。2× RT Reaction Mix 包含优化的缓冲体系、Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers 和 dNTPs, 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45min 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, 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。

● 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. 配制逆转录反应体系

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

RNase-free ddH ₂ O	至20 µL
2× RT Reaction Mix	10 µL
PreScript II Enzyme Mix	2 µL
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. 按下列条件进行逆转录反应

25°C	5min
42°C	45min
70°C	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°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。
- ❖ 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。