



PreScript III RT ProMix For qPCR

货号: R420A/B

- 产品内容

组分	R420A	R420B
2× RT Reaction Mix	500 μL	1 mL
PreScript III 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 III Enzyme Mix 并短暂离心至管底后置于冰上备用。

● 产品简介

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。PreScript III RT ProMix For qPCR 基于 PreScript III 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 III Enzyme Mix 包含 PreScript III 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，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 III 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
50°C	15min
85°C	2min

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。