

## ● 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。
- ❖ 请勿将4× gDNA clearer 与其它 RT 试剂配套使用，因为产品所带的10×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 III RT ProMix For qPCR (+gDNA clearer)

货号：R421A/B

### ● 产品内容

组分	R421A	R421B
4× gDNA clearer	200μL	400μL
10× RT Reaction Mix	100μL	200μL
Prescript III Enzyme Mix	100μL	200μL
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1mL	1mL

### ● 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 和 10× 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 (+gDNA clearer) 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。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)<sub>23</sub>VN、Random hexamers、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。

本产品针对 qPCR 进行特别优化，比例优化的 Random primers/Oligo (dT)<sub>23</sub>VN 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 <sub>2</sub> 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°C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 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。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°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。