

First Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA clearer)

【产品内容】

组分	E0106S	E0106L
4× gDNA clearer	200μL	400 μL
10× RT Reaction Mix	100 μL	200 μL
PreScript III Enzyme Mix	100 μL	200 μL
Oligo (dT) ₂₃ VN(50 μM)	50 μL	100 μL
Random hexamers(50 ng/μL)	50 μL	100 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℃ 保存。从 -20℃ 取出使用时，将冻存的 4× gDNA clearer、10× RT Reaction Mix、Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers 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】

本产品基于 PreScript III Reverse Transcriptase，包含合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分，适合于后续的 PCR、qPCR 以及 PCR 克隆。4× gDNA clearer 可彻底去除残留的基因组 DNA 污染，保证后续结果更加可靠。10× RT Reaction Mix 包含优化的缓冲体系、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。可根据需要，选择 Oligo (dT)₂₃VN、Random hexamers 或基因特异引物作为逆转录引物。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。

【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 检测高丰度基因的表达式。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，R2 > 0.990，扩增效率在 0.9 到 1.1 之间。

【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 是溶于水而不是 TE 中，因为 TE 中的 EDTA 会对逆转录反应产生抑制。

【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 12 μL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μL
或 Random hexamers (50 ng/μL)	1 μL
或基因特异反转引物 (2 μM)	
Total RNA or Poly A RNA	10 pg ~ 5 μg

用移液器轻轻吹打混匀并短暂离心，65℃ 加热 5 min，迅速置于冰上骤冷，并在冰上静置至少 2 min。

2) 基因组 DNA 去除

上一步混合液	12 μL
4× gDNA clearer	4 μL

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。

3) 配制第一链 cDNA 合成反应液

上一步反应液	16 μL
10× RT Reaction Mix	2 μL
PreScript III Enzyme Mix	2 μL

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后上机。

4) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25℃☆	5 min
50℃	30 min
85℃	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℃ 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。

2. 后续实验为 qPCR

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 14 μL
4× gDNA clearer	4 μL
模板 RNA	10 pg - 5 μg

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) 配制第一链 cDNA 合成反应液

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

上一步反应液	14 μL
10× RT Reaction Mix	2 μL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μL
Random hexamers (50 ng/μL)	1 μL
PreScript III Enzyme Mix	2 μL

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后进行下一步反应。

3) 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

25℃	5 min
50℃	15 min
85℃	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℃ 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。