

RT ProMix For qPCR (+gDNA clearer)

【产品内容】

组分	E0107S	E0107L
gDNA clearer	200 μ L	400 μ L
2.5 \times PreScript III RT ProMix	400 μ L	800 μ L
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 $^{\circ}$ C 保存。从 -20 $^{\circ}$ C 取出使用时，将冻存的 gDNA clearer 和 2.5 \times PreScript III RT ProMix 融解，然后轻轻颠倒混匀后短暂离心至管底，置于冰上备用。

【产品简介】

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。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；2.5 \times PreScript III RT ProMix 包含 PreScript III Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、优化的缓冲体系、Oligo (dT)23VN、Random hexamers、dNTPs 和 gDNA clearer 终止成分。

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，可以在 15 min 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 μ g HeLa 细胞总 RNA 为模板，RT-qPCR 检测高丰度基因的表达水平。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。

【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；
- 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 12 μ L
gDNA clearer	4 μ L
模板 RNA	10 pg - 5 μ g

用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ 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	12 μ L
2.5 \times PreScript III RT ProMix	8 μ L

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 $^{\circ}$ C	5 min
50 $^{\circ}$ C	15 min
85 $^{\circ}$ C	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 $^{\circ}$ C 保存，并在两个月内使用；长期存放建议分装后在 -80 $^{\circ}$ 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 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 gDNA clearer 与其它 RT 试剂配套使用，因为产品所带的 2.5 \times PreScript III RT ProMix 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。