

产品概述

Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix for qPCR 试剂盒提供了所有用于 cDNA 第一链合成的试剂,适用于两步法 qRT-PCR 检测。本产品中 4×gDNA Wiper Mix 可彻底去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA,使定量结果更加准确,并可简化 qPCR 引物设计,无需跨内含子设计引物。本产品中 5×Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix 是一款高效、快捷的 cDNA 一链合成预混液,加入 RNA 模板和无酶水即可进行逆转录反应。使用本制品合成的 cDNA 适用于 SYBR Green 和探针法 qPCR,可以根据实验目的,选择相应的试剂配合使用,进行高性能的基因表达分析。

试剂组成

组分	BR1D301-02 100T (20 μL/T)	BR1D301-03 500T (20 μL/T)
4×gDNA Wiper Mix	400 μL	5×400 μL
5×Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix ¹	400 μL	5×400 μL
5×No RT Control Mix ²	40 μL	5×40 μL
RNase-free ddH ₂ O	2×1mL	10×1mL

1. 本试剂含有抑制 DNase 活性的组分,经过 4×gDNA Wiper Mix 处理后的样品可以直接进行反转录反应合成 cDNA,因此可迅速完成从基因组 DNA 去除到 cDNA 合成的全过程;本试剂包含了 Random 6 mers、Oligo (dT)18 Primer 两种引物以及 dNTPs,可以均匀合成各种 cDNA;
2. 本试剂除不含 Neoscript RTase 外,其余成分与 5×Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix 相同,用于配制 No RT 对照反应。

保存条件

-20±5°C 存储。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融,反复冻融可能使产品性能下降,如每次使用量较少,推荐小份分装使用。
3. 在进行长片段扩增时,为了防止 cDNA 结构被破坏,建议以 70°C 处理 15 min 为酶灭活条件。
4. RNase Inhibitor 的加入能有效抑制提取的 RNA 模板中带入的核酸酶对 RNA 模板的降解作用。
5. 高纯度、完整的 RNA 模板对于逆转录高质量及完整的 cDNA 链非常关键。gDNA Wiper 的加入,最大程度保障了 qPCR 检测结果的稳定性和可靠性。

逆转录反应体系配制

1. 体系配制 (在冰上进行配制)。

试剂	加量
4×gDNA Wiper Mix	4 μL
Template RNA	10 pg-1 μg*
RNase-free ddH ₂ O	To 16 μL

*根据实验要求加入合适的 RNA 量。

2. 使用移液器吹打混匀后,42°C 加热 2 min (可使用 PCR 仪控温)。

3. 在上述体系中加入以下组分, 至总体积为 20 μL (在冰上进行配制), 轻轻混匀。

试剂	加量
5 $\times$ Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix	4 μL

4. 逆转录程序为: 50 $^{\circ}\text{C}$ * 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5s。

*对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板, 可适当升高反应温度。

5. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应, 或置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

qPCR 反应体系配制

以下是使用 Robostart SYBR qPCR Premix (Universal Rox) (货号: BR1A501) 在荧光定量 PCR 仪上进行后续 qPCR 检测的操作流程。如配套 BR1E102 或者宝锐其他 qPCR 产品使用, 请参考对应产品说明书。

试剂	加量
2 $\times$ Robustart SYBR qPCR Premix (Universal Rox)	10 μL
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL
cDNA*	—
RNase-free ddH ₂ O	To 20 μL

*建议使用 RNase-free H₂O 稀释 cDNA, 同时 cDNA 的加入量不超过 qPCR 反应体系总体积的 1/10。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
预变性 ¹	95℃	5 min	1
变性	95℃	10 s	40
*退火延伸 ²	55℃	40 s	
*熔解曲线分析 ¹			

1. 预变性条件适合绝大多数扩增反应, 如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至 3 分钟以提高预变性效果。

2. 超过 200 bp 时, 推荐延伸时间适当延长, 退火延伸的温度根据设计的引物 T_m 值进行调整。

3. 熔解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定。

4. *标注处设置信号采集。