

产品概述

Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR 试剂盒提供了所有用于 cDNA 第一链合成的试剂,可在一管内进行基因组清除与 RNA 逆转录两个反应,可有效降低复杂加样过程造成的样品污染和 RNA 降解的风险,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 4×Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR 是一款高效、快捷的 cDNA 一链合成预混液,最快可在 5 min 内完成基因组清除和逆转录反应,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 可兼容染料法和探针法 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	BR1D303-01 100 T (20 µL/T)	BR1D303-02 500 T (20 µL/T)
4×Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR*	0.5 mL	5×0.5 mL
RNase-free ddH ₂ O	2×1mL	10×1mL

*本试剂含有热敏型 DNase, Random 6 mers、Oligo (dT)18 Primer 两种引物以及 dNTPs,可同时完成基因组 DNA 去除和均匀合成各种 cDNA。

保存条件

-20±5°C长期保存。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. 本试剂盒中试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀,尽量避免起泡,并经短暂离心后使用。
3. 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。
4. 本产品采用热敏型 DNase,请务必将 4×Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR 置于冰上。
5. 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。

逆转录反应体系配制

1. 体系配制 (在冰上进行配制)。

试剂	加入量
4×Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR	5 µL
Template RNA	10 pg-1 µg*
RNase-free ddH ₂ O	To 20 µL

*根据实验要求加入合适的 RNA 量。

2. 轻轻混匀,按照如下反应程序进行逆转录

温度	时间
50°C ¹	5 min ²
85°C	5 s

- 1.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。
- 2.长片段扩增可延长逆转录时间至 10 min,延长反应时间可提高 cDNA 得率。

货号: BR1D303

4×Neoscript All-in-One cDNA Synthesis Premix for qPCR

V02



3.产物可直接用于 qPCR 反应,或-20℃短期保存;若需长期保存,建议分装后,于-80℃保存,避免反复冻融。

qPCR 反应体系配制

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

试剂	20 μL 体系
2×FastAmpli SYBR qPCR Premix (Universal ROX)	10 μL
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL
Template DNA	—
RNase-free ddH ₂ O	To 20 μL

反应条件

普通 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
预变性	95℃	1 min	1
变性	95℃	10 s	40
*退火延伸	56-64℃	30 s	
*熔解曲线分析			

快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
预变性	95℃	30 s	1
变性	95℃	1 s	40
*退火延伸	56-64℃	10 s	
*熔解曲线分析			

Q&A

Q1: 转录后的产物是什么? 是双链的 DNA 吗?

A1: 反转录后的产物是 RNA 和 cDNA 的杂交链,并不是 DNA 双链,其稳定性相较于后者来说要低一些。

Q2: RT-qPCR 后,无扩增曲线的原因?

A2: 在反转录反应前建议电泳验证 RNA 的完整性,确认 RNA 没有降解。RNA 不要保存时间过长,尽快进行上机操作。