

产品概述

Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix for qPCR (+gDNA wiper) 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	BR1D301-01 10 rxn (20 µL/rxn)	BR1D301-02 100rxn (20 µL/rxn)
4×gDNA Wiper Mix	40 µL	400 µL
5×Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix ¹	40 µL	400 µL
5×No RT Control Mix ²	4 µL	40 µL
RNase-free ddH ₂ O	200 µL	2×1mL

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℃长期保存, 4℃可保存 3 个月。使用前应混匀, 避免反复冻融。

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×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℃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	加入量
5×Neoscript 1st cDNA Synthesis Premix	4 µL

4. 逆转录程序为: 50℃* 15 min; 85℃ 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℃保存。

货号：BR1D301

Neoscript 1st cDNA Synthesis
Premix for qPCR (+gDNA wiper)

2025V01



qPCR 反应体系配制

以下是使用本产品进行逆转录后，选用 Robustart SYBR qPCR Premix (Universal Rox) (BR1A501) 试剂，在荧光定量 PCR 仪器上进行后续 qPCR 检测的过程。

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

*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

普通 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	10 s	40
退火延伸*	55°C	40 s	
熔解曲线分析			

*荧光信号采集。

质量控制

1. 功能检测：qPCR 的敏感性、特异性、可重复性。
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

技术说明

1. 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。
2. 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。
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. 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，最大程度保证了 qPCR 结果的真实性和可重复性。