

NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix

(gDNA Purge)

目录号: E047

01/ 产品描述

第一链cDNA合成预混液是以mRNA或者总RNA为模板，高效合成第一链cDNA。本产品含有逆转录反应所需的全部试剂（NovoScript® II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Oligo(dT)₁₈, Random N6, dNTPs）。反应时只需要加入RNA模板和水即可，操作简单，降低操作过程中的污染。制品中含有去基因组成分gDNA Purge，以RNA为模板进行cDNA第一链合成时，只需一步操作，可以同步去除基因组DNA污染，反应结束后，85℃加热5秒钟，就可以失活逆转录酶，RNA酶抑制剂。合成的第一链cDNA能直接用于PCR或荧光定量PCR的模板，第二链cDNA的合成或线性RNA扩增，也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验。

另外，本产品提供了2×NovoScript® Plus No RT Control，用于配制无逆转录酶对照反应，检验RNA模板中是否存在基因组DNA残留。

02/ 产品特点

- 1) 本制品采用耐高温逆转录酶，大幅提高热稳定性和 cDNA 合成效率；
- 2) 本制品中添加的 NovoScript® II Reverse Transcriptase 无 RNase H 活性，可避免第一链 cDNA 合成过程中，RNA/DNA 杂交模板链中 RNA 降解，保证 cDNA 合成的质量；
- 3) 本制品中 Random N6 和 Oligo(dT)₁₈ 引物比例经过优化，可均匀合成样品中的 cDNA；
- 4) 本制品中含有去基因组成分，逆转录时可同步去除基因组 DNA 污染。

03/ 保存温度

-20℃储存。

04/ 产品包装

产品组成	A 包装	B 包装
2×NovoScript® Plus 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	500μl	1ml
gDNA Purge	50μl	100μl
2×NovoScript® Plus No RT Control	50μl	100μl
RNase Free Water	1ml	1ml×2

05/ 注意事项

- 1) 用 DEPC 处理实验用到的所有实验器材，或者购买已经证明无核酸酶的实验用具，实验过程戴手套并经常更换手套，避免 RNA 酶的污染。
- 2) 确保所用试剂中无 RNA 酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在逆转录过程中，所有管子要确保扣严。
- 4) 纯化过的 RNA 必须保证不含有盐，金属离子，乙醇和苯酚，以上成分会干扰第一链 cDNA 的合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除掉痕量污染物。
- 5) 为保证逆转录反应的有效进行，需使用高质量的 RNA 模板。
- 6) 当模板含量较低或后续 PCR 扩增片段过长时可以适当延长逆转录时间。
- 7) 2×NovoScript® Plus 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix、gDNA Purge 及 2×NovoScript® Plus No RT Control 含有甘油，使用前请充分混匀后并短暂离心收集至管底再进行使用。

06/ 操作方法

I. cDNA 第一链合成

试剂融化后，各组份混匀短暂离心后置于冰上。

1) 反应体系配制：

2×NovoScript® Plus 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	10μl
模板 RNA	总 RNA(0.1 ng -1μg)
	mRNA(≥10 pg)
	特异性 RNA(≥0.01 pg)
gDNA Purge	1μl
RNase Free Water	至 20μl

移液器轻轻混匀后短暂离心至管底。

2) No RT Control 反应（可选）

用于配制无逆转录酶对照反应，检验 RNA 模板中是否存在基因组 DNA 残留。

2×NovoScript® Plus No RT Control	10μl
模板 RNA	总 RNA(0.1 ng -1μg)
	mRNA(≥10pg)
	特异性 RNA(≥0.01pg)
gDNA Purge	1μl
RNase Free Water	至 20μl

移液器轻轻混匀后短暂离心至管底。

3) 反应程序

温度	时间
50°C	15min
85°C	5s

注：反应产物可直接用于 qPCR，如果不立即使用，可在-20°C 短期保存，长时间保存建议分装后，于-70°C 保存，避免冻融。

II. 第一链 cDNA 的 qPCR 扩增

合成的cDNA第一链最佳投入量以qPCR得到的Ct值在15-30个循环为宜。

常用反应体系（20μl）：

2×NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus*	10μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
模板	1-2μl
ROX (根据机器型号选择)	0.4μl
RNase Free Water	至 20μl

*：近岸蛋白染料法荧光定量试剂盒（目录号：E096）。

两步法扩增程序：

95°C	1min
35-45 次循环：	95°C, 20 sec 60°C, 1min

三步法扩增程序：

95°C	1min
35-45 次循环：	95°C, 20 sec 50-60°C, 20 sec 72°C, 30 sec