

SynScript® III RT SuperMix for qPCR (+gDNA Remover)

■ 目录号

TSK314S
TSK314M

■ 产品简介

本产品是专为两步法RT-PCR第一步cDNA第一链合成研制的预混液，浓度为5×，它包含SynScript® III RT6逆转录酶、RNasin、DTT、dNTPs、Randomer、Oligo(dT)₁₇以及最适的反应缓冲液等。

产品中的SynScript® III RT6逆转录酶由改造的莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV RT)经体外大肠杆菌重组表达而来。野生型M-MLV RT在分子生物学实验中有两个明显的缺点：(1)具有RNase H活性。它会降解RNA模板及中断cDNA链的合成；(2)热稳定性差。RNA以各种复杂的多级结构存在，提高逆转录反应的温度，破坏其复杂结构的稳定性有利于逆转录的顺利进行，但同时也使酶的活性大大降低。SynScript® III RT6逆转录酶解决了上述两个问题。通过删除M-MLV RT的RNase H活性，能有效减少RNA模板的降解，使其聚合酶活性和持续性大大增强；其后通过随机突变筛选出热稳定性强的逆转录突变体，使其反应温度提高至50°C，有利于含复杂结构RNA的逆转录进行。

本产品提供的5×gDNA Remover Mix可彻底去除RNA模板中残留的基因组DNA，qPCR结果更加可靠，并可简化qPCR引物设计，无需跨内含子设计引物。

01

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

■ 产品组成

组分	TSK314S (50次)	TSK314M (100次)
5×SynScript® III RT SuperMix	200 μL	200 μL×2
5×gDNA Remover Mix	100 μL	100 μL×2
RNase-free Water	1.0 mL	1.0 mL×2

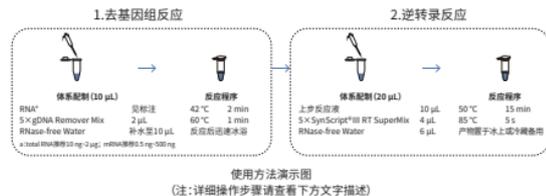
■ 产品应用

本产品合成的第一链cDNA主要用于实时荧光定量PCR扩增反应。

■ 产品特点

- 使用方便，体系配制更加简单；
- 反应快速，逆转录反应只需15 min即可完成；
- 转录效率和持续性高，可获得高产量cDNA；
- 热稳定性强，有利于含复杂结构RNA的逆转录进行；
- 快速有效地去除基因组污染；
- 5×SynScript® III RT SuperMix 中含有RNasin，能够减少RNA降解。

■ 使用方法



02

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

- 1) 将RNA模板和试剂盒中的各种组分置于冰上融解备用。
- 2) 在无核酸酶的微量离心管中按照下方表格在冰上配制反应体系 (10 μL)：

组分	用量
RNA模板 ^a	见标注
5×gDNA Remover Mix	2 μL
RNase-free Water	Up to 10 μL

a. 模板为总RNA时，推荐用量为10 ng~2 μg；模板为mRNA时，推荐用量为0.5 ng~500 ng。

- 3) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心，42°C孵育2 min，60°C孵育1 min。
- 4) 反应液迅速置于冰上冷却，短暂离心后加入下方组分：

组分	用量
5×SynScript® III RT SuperMix	4 μL
RNase-free Water	Up to 20 μL

- 5) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心，50°C孵育15 min，85°C孵育5 s，逆转录产物置于冰上或冷藏备用。

■ 注意事项

- 实验中应避免RNase污染，防止RNA降解或实验中的交叉污染。操作人员需佩戴口罩和一次性手套，实验中经常更换手套，使用专门的仪器和耗材。
- 为保证逆转录成功，请使用高质量的RNA。推荐使用琼脂糖凝胶电泳的方法检测RNA完整性。

03

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

- 5×SynScript® III RT SuperMix为预混液，在-20°C不会冻结。使用前可颠倒数次混匀并短暂离心。
- 若为原核生物来源RNA或其他仅依赖随机引物进行逆转录的RNA，在50°C逆转录反应前增加25°C 10 min的反应程序，可提高产物得率。
- 逆转录产物用于扩增反应时，其用量不应超过总反应体积的10%。

■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
产物用于qPCR实验，无Ct值或Ct值偏大	RNA降解	重新提取和使用新鲜RNA，推荐使用琼脂糖凝胶电泳的方法检测RNA完整性；使用RNase-free耗材
	RNA纯度不高 (如苯酚、乙醇、多糖多酚等残留)	使用高质量RNA模板
	RNA浓度低或基因表达量低	适当增加RNA用量
	体系未充分混匀	将体系各组分置冰上溶解后，充分振荡混匀
qPCR引物质量差	重新设计高质量引物	
cDNA长期保存于4°C	重新制备cDNA；cDNA长期保存推荐温度为-20°C或-80°C；cDNA应避免反复冻融	
RNA用量或基因表达量高		适当减少RNA用量

04

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

产物用于qPCR实验, Ct值过小	cDNA用量过高	适当减少cDNA用量; 必要时,进行10倍的梯度 稀释预试验,得到最佳稀释倍数
	逆转录/qPCR体系/ 环境中存在大量 基因组污染	使用gDNA remover对 RNA进行处理; 使用Trelief® Solution核酸清洁液 (目录号:TSP001) 对环境进行清洁处理
产物用于qPCR实验, 熔解曲线多峰	引物特异性差	重新设计高特异引物
	基因组污染	使用gDNA remover对 RNA进行处理
	qPCR体系污染	使用RNase-free耗材
产物用于qPCR实验, 阴性对照 有扩增曲线	环境或气溶胶核酸污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液 (目录号:TSP001) 对环境进行清洁处理
	qPCR体系污染	使用RNase-free耗材

■ 应用实例

下方试验为使用本产品进行小鼠 (*Mus musculus*) 总RNA的逆转录,产物用于GADPH基因的qPCR扩增。

· 逆转录反应

- 1) 将RNA模板和试剂盒中的各种组分置于冰上融解备用。
- 2) 在无核酸酶的微量离心管中按照下方表格于冰上配制反应体系 (10 μ L):

组分	用量
Mus musculus Total RNA (125 ng/ μ L)	1 μ L
5 \times gDNA Remover Mix	2 μ L
RNase-free Water	7 μ L

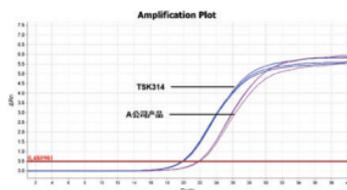
- 3) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心, 42°C孵育2 min, 60°C孵育1 min。
- 4) 混合物迅速置于冰上冷却, 短暂离心后加入下方组分:

组分	用量
5 \times SynScript®III RT SuperMix	4 μ L
RNase-free Water	6 μ L

- 5) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心, 50°C孵育15 min, 85°C孵育5 s, 逆转录产物置于冰上或冷藏备用。

· Real-time Quantification PCR反应

在进行Real-time Quantification PCR反应时, 需要对逆转录产物进行稀释 (建议稀释3~10倍), 使内参基因Ct值在15~20之间, 取1 μ L稀释后的cDNA为模板进行qPCR反应, 结果如下:



不同逆转录产品逆转录产物应用于qPCR后实验结果

注: 针对小鼠GADPH基因设计qPCR引物, 使用本公司2 \times T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) (目录号:TSE202) 进行qPCR反应; A公司逆转录Mix的逆转录反应按照其说明书进行。

■ 保存条件

-25~-15°C保存, 保质期1年, 干冰运输。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

