



KT First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR (with dsDNase)

目录号

MG-QZ-01

产品组成

组分	规格 (100 次)
KT First-strand cDNA Synthesis Mix	400 μ L
dsDNase	2 \times 50 μ L
10 \times dsDNase Buffer	200 μ L
Nuclease-Free Water	2 \times 1.0 mL

保存条件

-20 $^{\circ}$ C保存 12 个月。

产品简介

本产品是一款高效、便捷的第一链 cDNA 合成试剂，KT First-strand cDNA Synthesis Mix 中包含 KT Reverse Transcriptase 及其反应 Buffer、Rnasin、dNTPs、Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物等第一链 cDNA 合成所需的所有组分，仅需加入 RNA 模板和水即可进行逆转录反应。

本产品中包含的 KT Reverse Transcriptase 是新一代逆转录酶，50 $^{\circ}$ C 反应，热稳定性强、逆转录效率高。dsDNase 可有效去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA，保证后续定量结果更加可靠，qPCR 引物无需跨内含子设计。使用本产品逆转录得到的 cDNA 可用于下游 qPCR 检测。

产品特点

- ◇ 热稳定性强：50 $^{\circ}$ C 反应，提高了 RNA 模板复杂二级结构的逆转录效率；
- ◇ 简便快捷：基因组去除与逆转录可一步完成。仅需加入 RNA 模板和水即可进行逆转录反应；
- ◇ 逆转录效率高：与市面上同类产品对比，本产品的逆转录效率更高。

适用范围

本产品适用于动物、植物及微生物 RNA 模板的第一链 cDNA 合成反应，经本产品逆转录得到的产物

本产品仅供科研使用



可兼容下游的染料法 qPCR 检测和探针法 qPCR 检测。

注意事项

1. 预混液中包含有 Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物，不仅适用于含 Poly(A)结构的真核生物 mRNA，也适用于不含 Poly(A)结构的原核生物 RNA、真核生物 rRNA 和 tRNA 等模板的逆转录，但不适用于 miRNA 等小 RNA 模板的逆转录；
2. 20 μL 逆转录体系中建议 Total RNA 的加入量不超过 1 μg，若加入 RNA 过量，可能会抑制逆转录反应；
3. 建议将逆转录得到的 cDNA 原液稀释 5~10 倍后再作为 qPCR 反应的模板，若直接使用 cDNA 原液作为模板，建议 cDNA 原液体积不超过 qPCR 反应体积的 1/10；
4. 逆转录产物建议立即用于 qPCR 反应或保存于 -20°C 后尽快使用。若需要长期保存，建议于 -80°C 保存，避免反复冻融。

使用方法

◇ 一步法逆转录流程 (适用于基因组 DNA 含量较低的 RNA 样品)

在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液 (冰上配制)

组分	使用量
RNA 模板*	50 ng~1 μg
KT First-strand cDNA Synthesis Mix	4.0 μL
dsDNase	1.0 μL
Nuclease-Free Water	Up to 20 μL

*模板：推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应：

温度	时间
37°C	2 min
55°C	15 min
85°C	5 min

◇ 两步法逆转录流程 (适用于基因组 DNA 含量较高的 RNA 样品)

1. 基因组 DNA 去除：

在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液 (冰上配制)：

本产品仅供科研使用



组分	使用量
RNA 模板*	50 ng~1 μ g
KT First-strand cDNA Synthesis Mix	1.0 μ L
dsDNase	1.0 μ L
Nuclease-Free Water	Up to 10 μ L

*推荐使用试剂盒提取的 RNA 作为模板。

用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应（反应结束后立即置于冰上）：

温度	时间
37°C	2~5 min*
65°C	2 min

*若 RNA 模板中基因组 DNA 含量较多，可适当延长 37°C 孵育时间至 5min。

2. 第一链 cDNA 合成 (冰上配制)

组分	使用量
“第 1 步”的反应产物	10 μ L
KT First-strand cDNA Synthesis Mix	4.0 μ L
Nuclease-Free Water	Up to 20 μ L

用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应：

温度	时间
25°C	10 min*
50°C	15 min
85°C	5 min

*当目标 RNA 不含有 Poly(A)结构时，可进行此步骤。

常见问题与解决办法

Q1: 逆转录后的 cDNA 产物进行 qPCR 检测，CT 值偏高？

A1:

- (1) 模板 RNA 提取失败或存在降解。建议在逆转录反应前一定要电泳验证 RNA 的完整性，提取 RNA 后尽快进行逆转录及 qPCR 操作；
- (2) 基因表达量较低。可适当提高模板 RNA 用量；
- (3) 逆转录体系、程序或加样等操作不当。建议按照说明书规范操作。

本产品仅供科研使用



Q2: 逆转录后进行 qPCR, 熔解曲线非单一峰?

A2:

- (1) RNA 模板中含有 gDNA。建议逆转录前进行去基因组反应或引物跨内含子设计;
- (2) qPCR 引物特异性差。重新设计特异性较好的引物, 可通过常规 PCR 检测引物特异性;
- (3) 引物过量。引物过量可能形成引物二聚体, 建议按说明书推荐用量添加;
- (4) 体系可能存在污染。设置无模板阴性对照 (NTC) 检查体系是否存在污染, 若存在污染, 建议更换试剂及耗材, 使用核酸清洁剂清洁操作台面及实验环境中的气溶胶污染。