



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

TRUEscript RT MasterMix (OneStep gDNA Removal)

地 址：武汉市新技术开发区高新大道 666 号 2 栋

电 话：15572895186（微信同号）

网 址：www.keepbio.cn 技术 QQ：781634607

使用说明书

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC7001	20 μ l $\times$ 50次
PC7002	20 μ l $\times$ 100次

Components	PC7001	PC7002
5 $\times$ TRUE RT MasterMix	200 μ l	400 μ l
gDNA Remover	50 μ l	100 μ l
RNase free H ₂ O	1.5ml	1.5ml

产品储存： -20°C 保存，有效期 12 个月

制品说明： 本制品采用分子进化技术多点突变的新一代反转录酶，大幅度提高了热稳定性和反转录效率。5 $\times$ TRUE RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix，含有反转录所需的所有试剂（TRUEscript H⁺ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer），只需加入模板 RNA 和水即可进行反应。使得 cDNA 的合成更加的方便快捷，特别适合 cDNA 合成以后的两步法 Real Time PCR 检测。通常 Real Time RT-PCR 等实验需要先用 DNase I 消化去除 RNA 中残留的基因组 DNA(gDNA)，但是传统 DNase I 处理复杂并容易造成 RNA 的降解和损失。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover，只需一步操作，即可同时完成基因组清除与逆转录反应，极大简化了操作步骤，避免了复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。

适用范围： 第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

产品特点：

1. 新一代反转录酶大幅度提高了热稳定性和反转录效率。
2. 全预混的反转录Mix，只需一步同时加入gDNA Remover、模板RNA 和水，实现cDNA 合成和去除基因组DNA同时进行。15分钟简单快速完成反转录。
3. RNA模板的体积最多可加到总体积的80%，非常适合于低浓度RNA模板的逆转录反应。
4. 预混合Mix在-20°C不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单。
5. 本产品针对qPCR进行特别优化oligo dT和N6随机引物配比，使cDNA合成可从RNA转录本的各个区域起始并具有相同的反转录效率，最大程度保证了qPCR结果的真实性和可重复性。

第一链cDNA合成(以20 μ l反应体系为例，也可以采用10 μ l反应体系)

1. 将模板RNA、gDNA Remover、5 $\times$ TRUE RT MasterMix在冰上解冻；RNase free H₂O在室温（15-25°C）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。

2. 在RNase free管里面加入以下成分：(建议使用PCR管冰上配制，置PCR仪反应)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 15 µl *
5 × TRUE RT MasterMix	4 µl (见注意事项 3)
gDNA Remover	1 µl (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 20 µl (补足到总体积 20 µl)

* Total RNA 不超过 2 µg, mRNA 不超过 200 ng (20 µl 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀(总体积20µl)

如使用mRNA模板是来源于真核细胞（如人、小鼠的组织细胞）含有Poly(A)尾结构，42°C孵育15 min。

如使用mRNA模板是来源于原核细胞（细菌）或者病毒等不含Poly(A)尾结构，25°C孵育10 min，42°C孵育15 min。

注意：如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至50°C-55°C（先在42°C孵育2分钟以清除基因组DNA），有助于提高产量。

4. 85°C加热 5 sec 失活TRUEscript H⁻ RTase和gDNA Remover。
5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20°C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

RT-qPCR

取适量反转录cDNA产物（一般不超过qPCR反应体积的1/10）作为qPCR模板，按照厂家荧光定量PCR试剂说明书（艾德莱货号：PC59）进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。

注意事项:

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. 5 × TRUE RT MasterMix和gDNA Remover含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5 × TRUE RT MasterMix和gDNA Remover内包含的酶均为过量，即使每次5 × TRUE RT MasterMix按照3.6 µl-3.8 µl使用，gDNA Remover按照0.8 µl-0.9 µl也不影响使用效果。