



TRUEscript RT MasterMix (OneStep gDNA Removal)

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 24 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(科尔普货号: PC62)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。