



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

TRUEscript 1st Strand cDNA

Synthesis Kit With gDNA Eraser

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
PC5401	50次
PC5402	100次

Components	PC5401	PC5402
4 × gDNA Eraser Mix	200 μl	400 μl
5 × TRUE RT MasterMix II	200 μl	400 μl
5 × No RTase Control Mix*	20 μl	40 μl
RNase free H ₂ O	1 ml	1 ml

* 5 × No RTase Control Mix 和 5 × TRUE RT MasterMix II 成分完全一致，只是不含 TRUEscript H⁺ RTase 反转录酶，可以用于反转录的阴性对照。

产品储存： -20℃ 保存，有效期 12 个月

制品说明： 本产品是一种高效、稳定、快速并可以去除基因组 DNA 污染的反转录系统。本试剂盒为一管式反转录预混 Mix，5 × TRUE RT MasterMix II 中含有反转录第一链合所需的所有试剂（TRUEscript H⁺ RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer）。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 4 × gDNA Eraser Mix 2 分钟消除 gDNA 残留，不需要 DNase 消化和后续繁琐步骤。

适用范围： 第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

特点： 不需要传统繁琐的DNase I消化，采用gDNA Eraser Mix极大简化了DNA残留的清除流程。全预混的反转录Mix和gDNA Eraser Mix大大减少了加样工作量和降低RNA污染几率。同时2种Mix在-20℃不易冻结，减少了化冻和混匀时间，使用方便。特殊优化的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逆转录效率，最大程度保证了qPCR结果的真实性和可重复性。反转录效率高。只需42℃，15-20 min即可完成cDNA第一链的合成。合成cDNA片段长度最高可达12 kb。

操作步骤（以20 μl 反应体系举例）：

1. 将模板RNA在冰上解冻；4 × gDNA Eraser Mix和RNase free H₂O在室温（15-25℃）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，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)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 12 μl *
4 × gDNA Eraser Mix	3.8-4 μl (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 16 μl (补足到总体积 16 μl)

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

3. 轻轻混匀，42℃ 孵育2分钟（或者37℃ 孵育5分钟）。此孵育步骤建议PCR仪器上进行。

4. 瞬间离心收集反应液至管底，置冰上，继续在同一管加入如下成份：

Components	Volume
5 × TRUE RT MasterMix II	3.8-4 μl (见注意事项 3)

5. 轻轻混匀（总体积20 μl）

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℃孵育15-20min。

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℃孵育10 min，42℃孵育15-20min。

6. 85℃加热 5 min 失活TRUEscript H⁺ RTase和gDNA Eraser。

7. 置冰上，合成的cDNA可以用于下一步荧光定量PCR。需较长时间保存时，请于-70℃保存，避免反复冻融。

RT-qPCR

取1/10-1/5 体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板或者根据需求调节使用量。若后续实验为实时荧光定量PCR，逆转录产物的加量应不超过PCR体系终体积的1/10，例如50 μl 的PCR反应体系，逆转录产物的加量应不超过5 μl。按照厂家荧光定量PCR试剂说明书进行下一步荧光定量PCR。

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. 4 × gDNA Eraser Mix 、5 × TRUE RT MasterMix II 非常粘稠，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。4 × gDNA Eraser Mix 和5 × TRUE RT MasterMix II 可以每次按照3.8 μl使用，也不影响使用效果。
4. 可以不经过基因组去除步骤，直接用5 × TRUE RT MasterMix II进行逆转录，这样所得到的结果会与使用TRUEscript RT MasterMix(货号：PC58)相当。