



TRUEscript RT MasterMix (For real time PCR)

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
PC5801	20 μ l \times 50次
PC5802	20 μ l \times 100次

Components	PC5801	PC5802
5 \times TRUE RT MasterMix	200 μ l	400 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml

产品储存： -20 $^{\circ}$ 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。

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稳定性和反转录效率。
2. 全预混的反转录Mix，只需加入RNA和水，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 $^{\circ}$ 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和5 \times TRUE RT MasterMix在冰上解冻；RNase free H₂O在室温（15-25 $^{\circ}$ 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	\leq 16 μ l *
5 \times TRUE RT MasterMix	4 μ l (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 20 μ l (补足到总体积 20 μ l)

* Total RNA 不超过 2 μ g，mRNA 不超过 200 ng (20 μ l 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀（总体积20 μ l）

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C孵育10 min，42 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，有助于提高产量。

4. 85 $^{\circ}$ C加热 5 sec 失活TRUEscript H⁻ RTase。

5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20℃保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70℃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 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。5 × TRUE RT MasterMix内包含的酶均为过量，即使每次按照3.6 μl-3.8 μl使用，也不影响使用效果。