

产品说明书

基本信息

产品编号:	PS1506
产品名称:	TRUEscript RT MasterMix(OneStep gDNA Removal) - 一步基因组清除反转录/荧光定量用

产品简介

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 × 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反转录反应，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。

本产品适用于第一链 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。

组分:

组分	规格 50T	规格 100T
5 × TRUE RT MasterMix	200 μl	400 μl
gDNA Remover	50 μl	100 μl
RNase free H2O	1mL	2×1mL

操作步骤:

一: 第一链 cDNA 合成(以 20 μl 反应体系为例，也可以采用 10 μl 反应体系)
1: 将模板 RNA、gDNA Remover、5×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 管里面加入表 1 成分:(建议使用 PCR 管冰上配制，置 PCR 仪反应)
3: 移液器轻轻吹打混匀(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° C 孵育 15min。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 10min，42° C 孵育 15min。
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

产品说明书

孵育 2 分钟以清除基因组 DNA)，有助于提高产量。
4: 85° C 加热 5sec 失活 TRUEscriptH [™] RTase 和 gDNARemover。
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。
二: 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。

表 1

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 H2O	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)	

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×TRUEMasterMix 和 gDNARemover 含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，使用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5×TRUEMasterMix 和 gDNARemover 内包含的酶均为过量，即使每次 5×TRUEMasterMix 按照 3.6 μl-3.8 μl 使用，gDNARemover 按照 0.8 μl-0.9 μl 也不影响使用效果。

保存: -20℃，12 个月。