

# THERMOscript RT MasterMix

## (For real time PCR)



北京艾德莱生物科技有限公司  
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：[www.aidlab.cn](http://www.aidlab.cn) 邮箱：[info@aidlab.cn](mailto:info@aidlab.cn)

## 使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC6801	20 $\mu$ l $\times$ 50次
PC6802	20 $\mu$ l $\times$ 100次

Components	PC6801	PC6802
5 $\times$ THERMO RT MasterMix	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> 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高达 60 $^{\circ}$ C 的全新高温反转录酶，可以通读 GC 含量丰富，二级结构复杂的 RNA 模板，极大提高反转录效率。5  $\times$  THERMO RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix，含有反转录所需的所有试剂（THERMOscript H<sup>-</sup> 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，尤其GC含量高，复杂模板的高温反转录。

**产品特点：**

1. 新一代高温反转录酶极大提高包括复杂RNA模板的反转录效率，CT值一般提早2-3个循环。
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. 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。
4. 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。
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  $\mu$ l反应体系为例，也可以采用10 $\mu$ l反应体系)

1. 将模板RNA在冰上解冻；RNase free H<sub>2</sub>O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，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 $\mu$ l *
5 $\times$ THERMO RT MasterMix	4 $\mu$ l (见注意事项 3)
RNase free H <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l (补足到总体积 20 $\mu$ l)

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

3. 移液器轻轻吹打混匀（总体积20  $\mu$ l），25 $^{\circ}$ C 孵育10 min，50 $^{\circ}$ C 孵育15 min。

**注意：** 本制品在42 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C反转录均有稳定良好效果。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55 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C，有助于提高产量。

4. 85 $^{\circ}$ C加热 5 sec 失活THERMOscript H<sup>-</sup> RTase。
5. 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ 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 × THERMO 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 × THERMO 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。**