

THERMOscript RT MasterMix

(OneStep gDNA Removal)



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

包装量：

目录编号	包装单位
PC8801	20 μ l \times 50次
PC8802	20 μ l \times 100次

Components	PC8801	PC8802
5 \times THERMO RT MasterMix	200 μ l	400 μ l
gDNA Remover	50 μ l	100 μ l
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml

产品储存： -20°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°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和反转录时间（仅需 5 分钟）。5 \times THERMO RT MasterMix 为先进的一管式全预混合反转录 Mix，含有反转录所需的所有试剂（THERMOscript 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 合成以及后续的 Real Time PCR 检测或者克隆片段的扩增。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，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，5分钟简单快速完成反转录。
3. 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。
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 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 THERMO RT MasterMix在冰上解冻；RNase free H₂O在室温解冻，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PCR管里面加入以下成分：(建议使用PCR管配制，置PCR仪内反应)

Components	Volume
RNase free H ₂ O	to 20 μ l (补足到总体积 20 μ l)
5 \times THERMO RT MasterMix	4 μ l (见注意事项 3)
gDNA Remover	1 μ l (见注意事项 3)
模板 RNA	\leq 15 μ l *

* Total RNA 模板量常用量 1–2 μ g，不超过 2 μ g (20 μ l 体系)，可以根据 RNA 模板浓度进行增减用量。

3. 移液器轻轻吹打充分混匀按照如下程序进行反转录 (总体积20 μ l)

25°C ^a	5 min
50°C ^b	5 min ^c
85°C	5 sec

a 如使用 mRNA 模板是来源于真核细胞 (如人、动物、植物的组织细胞) 含有 Poly(A)尾结构，省略此步骤；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，推荐做此 25°C 孵育 5 min 的步骤，可以确保 N6 随机引物的有效退火，提高 cDNA 产量。

b 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高至55°C–60°C，有助于提高产量。

c 复杂二级结构或高GC区域模板的反转录，50°C反转录时间延长到5–15 min。

4. 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

cDNA产物可直接用作qPCR反应的模板。建议作为模板的cDNA产物的体积一般不超过qPCR反应体积的1/10(最大可以加到1/5)，按照厂家荧光定量PCR试剂说明书(艾德莱货号：PC59或者PC62)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艾德莱试剂盒提取的高质量RNA样品。
3. 5 \times THERMO 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 \times THERMO RT MasterMix和gDNA Remover内包含的酶均为过量，即使每次5 \times THERMO RT MasterMix按照3.6 μ l–3.8 μ l使用，gDNA Remover按照0.8 μ l–0.9 μ l也不影响使用效果。