

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

包装量：

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

Components	PC6801	PC6802
5 \times THERMO RT MasterMix	200 μ l	400 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。5 \times THERMO RT MasterMix 为一管式反转录预混 Mix，融合了基因组清除与 RNA 逆转录所需的全部组分，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 qPCR 检测（兼容染料法和探针法 qPCR 检测）或者克隆片段的扩增。

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. 新一代反转录酶大幅度提高了热稳定性和反转录效率。CT值一般提早2-3个循环。
2. 全预混的反转录Mix，只需一步同时加入模板RNA 和水，实现cDNA 合成和去除基因组DNA同时进行。5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。

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、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 4)
模板 RNA	\leq 16 μ l *

* Total RNA 模板量常用量 1-2 μ g，不超过 5 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
55°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，55°C反转录时间延长到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/ RT-qPCR

cDNA产物可直接用作qPCR/PCR反应的模板。建议作为模板的cDNA产物的体积一般不超过qPCR/PCR反应体积的1/10（最大可以加到1/5），按照推荐荧光定量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. 本制品最长可获得5 kb大小的cDNA，下游实验如需长片段PCR扩增，可使用艾德莱 PC18-TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (OneStep gDNA Removal)或者 PC44-THERMOscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(OneStep gDNA Removal)
4. 5×THERMO RT MasterMix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×THERMO RT MasterMix均为过量，**即使每次5×THERMO RT MasterMix按照3.6 μ l-3.8 μ l使用也不影响使用效果。**