北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

使 用 说 明 书

包 装 量：

目录编号	包装单位
D17625	50次
D17625	100次

Components	D17625	D17625
4 × gDNA Eraser Mix	200 µl	400 µl
5 × TRUE RT MasterMix	200 µl	400 µl
5 × No RTase Control Mix*	20 µl	40 µl
RNase free H_2O	1 .5 ml	1.5 ml

* 5 × No RTase Control Mix 和 5 × TRUE RT MasterMix 成分完全一致，只是不含 TRUEscript H^- RTase 反转录酶，可以用于反转录的阴性对照。

产品储存： −20°C 保存，有效期 12 个月

制品说明： 本产品是一种高效、稳定、快速并可以去除基因组 DNA 污染的反转录系统。试剂盒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。本试剂盒为一管式反转录预混 Mix，5 × TRUE RT MasterMix 中含有反转录第一链合所需的所有试剂（TRUEscript H^- RTase、RNase Inhibitor、Random primers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、Buffer）。 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 4 × gDNA Eraser Mix 2 分钟消除 gDNA 残留，不需要 DNase 消化和后续繁琐步骤。

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. 采用gDNA Eraser仅需2分钟清除DNA残留，不需要DNase 消化和后续繁琐步骤。
3. 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。
4. 同时2种Mix在-20°C不易冻结，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。

操作步骤 (以20 µl反应体系为例，也可以采用10µl反应体系)

1. 将模板RNA和5 × TRUE RT MasterMix 在冰上解冻；4 × gDNA Eraser Mix 和RNase free H_2O 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管里面加入以下成分：(建议使用PCR管冰上配制)

Components	Volume
Total RNA/mRNA	≤ 12 µl *
4 × gDNA Eraser Mix	4 µl (见注意事项 3)
RNase free H_2O	to 16 µl（补足到总体积 16 µl）

* Total RNA 建议不超过 2 μg，mRNA 不超过 200 ng (20μl 体系)

3. 移液器轻轻吹打混匀，42°C 孵育2分钟（或者37°C 孵育5分钟）。控温步骤均建议PCR仪器上进行。

4. 继续直接在同一管加入如下成份：

Components	Volume
5 × TRUE RT MasterMix	4 μl (见注意事项 3)

5. 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15-20min。
   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10 min，42°C 孵育15-20min。
   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，有助于提高产量。

6. 85°C 加热 5 sec 失活TRUEscript H^- RTase和gDNA Eraser。

7. 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

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. 4 × gDNA Eraser Mix 、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。4 × gDNA Eraser Mix 和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。**
4. 可以不经过基因组去除步骤，直接用5 × TRUE RT MasterMix 进行反转录，这样所得到的结果会与使用TRUEscript RT MasterMix

