

THERMOscript RT Kit (+gDNA Eraser)



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 邮箱: info@aidlab.cn

使用说明书

包装量:

目录编号	包装单位
PC6401	50次
PC6402	100次

Components	PC6401	PC6402
4 x gDNA Eraser Mix	200 μ l	400 μ l
5 x THERMO RT MasterMix II	200 μ l	400 μ l
5 x No RTase Control Mix*	20 μ l	40 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml	1 ml

* 5 x No RTase Control Mix 和 5 x THERMO RT MasterMix II 成分完全一致, 只是不含 THERMOscript 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 污染的高温反转录系统。试剂盒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。本试剂盒为一管式反转录预混 Mix, 5 x THERMO RT MasterMix II 中含有反转录第一链合所需的所有试剂 (THERMOscript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、Random Primer、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 x 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, 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. 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 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在冰上解冻; 4 x gDNA Eraser Mix和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, 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	$\leq 12 \mu$ l *
4 x gDNA Eraser Mix	4 μ l (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 16 μ l (补足到总体积 16 μ l)

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

- 移液器轻轻吹打混匀，42℃ 孵育2分钟（或者37℃ 孵育5分钟）。控温步骤均建议PCR仪器上进行。
- 继续直接在同一管加入如下成份：

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

- 移液器轻轻吹打混匀（总体积20 µl），25℃ 孵育10 min，50℃ 孵育15 min。
注意：本制品在42℃-60℃ 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℃-60℃，有助于提高产量。
- 85℃ 加热 5 min 失活THERMOscript H⁻ RTase和gDNA Eraser。
- 得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20℃ 保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70℃ 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：

- 避免RNase污染。
- 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
- 4 × gDNA Eraser Mix 、5 × THERMO RT MasterMix II 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 × THERMO RT MasterMix II内包含的酶均为过量，**即使每次按照3.6 µl-3.8µl使用，也不影响使用效果。**
- 可以不经基因组去除步骤，直接用5 × THERMO RT MasterMix II加RNA和水进行反转录，这样所得到的结果会与使用THERMOscript RT MasterMix(货号：PC68)相当。