



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

Thermoscript 1st Strand cDNA

Synthesis Kit (OneStep gDNA Removal)

包装量：

目录编号	包装单位
PC4402	50次
PC4403	100次

Components	PC4402	PC4403
5 × THERMO Reaction Mix	200 µl	400 µl
gDNA Remover	50 µl	100 µl
Oligo(dT)(0.5 µg /µl)	50 µl	100 µl
Random primer (N6)	50 µl	100 µl
RNase free H ₂ O	1 ml	1.5 ml

产品储存： -20°C 保存，有效期 12 个月

制品说明： 本制品以 RNA 为模板，采用预混合技术，用 5 × THERMO Reaction Mix（已经预混合了 THERMOscript H⁺ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer）高效合成第一链 cDNA，操作简单。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长度。可用于更长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。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、低拷贝基因的克隆和检测。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了包括复杂RNA模板的反转录效率和长度。合成cDNA长度高达15 kb以上。
2. 全预混的反转录Mix，只需加入RNA、引物和水，简单快速完成反转录。
3. gDNA Remover采用先进的一步基因组清除技术，最短时间最简单完成去除基因组DNA步骤。
4. RNA模板的体积最多可加到总体积的75%，非常适合于低浓度RNA模板的逆转录反应。
5. 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。
6. 用户可根据需要，可灵活选择Oligo (dT)、Random primer或基因特异引物作为逆转录引物。

引物选择：

1. 如果模板为真核生物来源，一般情况下首选Oligo (dT)，与真核生物mRNA的3' Poly A尾配对，可获得最高产量的全长cDNA。
2. 如果对一些物种，不能确定mRNA是否有polyA尾的情况下，首选Oligo (dT)，不成功再尝试基因特异性引物(GSP)和Random primer为引物。
3. gDNA Remover采用先进的一步基因组清除技术，最短时间最简单完成去除基因组DNA步骤。
4. 基因特异性引物(GSP)的特异性最高。但有些情况下，用于PCR反应的GSP无法有效引导第一链cDNA合成，可改用Oligo (dT)或Random primer重新进行逆转录。。
5. Random primer特异性最低，所有RNA，包括mRNA，rRNA，tRNA均可以作为Random primer的模板。当目标区域具有复杂二级结构或GC含量较高，或者模板为原核生物来源，使用Oligo (dT)或基因特异性引物(GSP)无法有效引导cDNA合成时，可使用Random primer为引物。
6. 如果合成cDNA下游用于荧光定量PCR，可将Oligo (dT)与Random primer混合使用（各加1µl/20µl反应体系），可使mRNA的各个区域cDNA合成效率相同，有助于提高定量结果的真实性和重复性。

第一链cDNA合成(以20 µl反应体系为例)

1. 加入以下成分（使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心收集液体到管底。）

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5 µg/5-500 ng
Oligo(dT)(0.5 µg /µl) or Random Primer(0.1 µg/µl) or GSP(Gene Specific Primer, 2 pmol/µl)	1 µl
5 × THERMO Reaction Mix	4 µl（见注意事项 4）
gDNA Remover *	1 µl（见注意事项 4）
RNase free H ₂ O	to 20 µl（补足到总体积 20 µl）

*如果反转录时不需要去除基因组DNA，直接略去gDNA Remover成分不加即可。

2. 轻轻混匀

如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP)，50°C孵育30-50 min（如产物用于qPCR，50°C孵育15 min）

如用Random Primer，25°C孵育10 min，50°C孵育30-50 min（如产物用于qPCR，50°C孵育15 min）

注意：本制品在42°C-60°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°C-60°C，有助于提高产量。

3. 85°C加热5 sec失活THERMOscript H⁻ RTase。

4. 得到的cDNA产物可立即用于PCR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-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 µl)的反转录产物作为PCR模板。丰度高的可以酌情适当稀释cDNA后使用。

建议PCR条件

请按照选择的艾德莱PCR试剂或者其它厂家PCR试剂说明书进行。

建议艾德莱配套PCR试剂

1. 常规扩增：**PC09-2xTaq PCR MasterMix** 和 **PC80-2xF8 FastLong PCR MasterMix**

2. 高保真扩增：**PC82-2xA8 FastHiFi PCR MasterMix** 和 **PC84-2xA8 FastHiFi PCR MasterMix**

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. **可选步骤（一般不需要）：**如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构、或者扩增cDNA长度超过3kb，可以先只加RNA模板、引物和RNase free H₂O混匀，65°C变性5分钟，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。

4. 5 × THERMO Reaction Mix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，使用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5 × THERMO Reaction Mix内包含的酶均为过量，即使每次按照3.6 µl-3.8 µl使用，gDNA Remover按照0.8 µl-0.9 µl也不影响使用效果。