武汉科尔普生物科技有限公司
Keep Biotechnologies Co.,Ltd
地　址：武汉市新技术开发区高新大道 666 号 2 栋
电　话：15572895186（微信同号）
网　址：www.keepbio.cn　技术 QQ：781634607

TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (OneStep gDNA Removal)

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC1802	50次
PC1803	100次

Components	PC1802	PC1803
5 × TRUE 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_2O	1.5 ml	1.5 ml

产品储存：-20°C 保存，有效期 12 个月

制品说明：本制品以 RNA 为模板，采用预混合技术，用 5×TRUE Reaction Mix（已经预混合了 TRUEscript 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多点突变的新一代反转录酶，具有更强的延伸能力和稳定性，可用于较长的 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。

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。合成cDNA长度高达12 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. 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。
4. 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。
5. 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×TRUE Reaction Mix	4 μl（见注意事项 4）
gDNA Remover *	1 μl（见注意事项 4）
RNase free H_2O	to 20 μl（补足到总体积 20 μl）

*下游实验为克隆基因时可不加gDNA Remover，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. 移液器轻轻吹打充分混匀按照如下程序进行第一链cDNA合成（总体积20 μl）

25°C[a]	5 min
42°C[b]	30 min[c]
85°C	5 sec

a. 仅当使用 Random Primer 时需要此步骤；使用 Oligo(dT)或 GSP 时省略此步骤。
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50°C，有助于提高产量。
c. 如果合成的cDNA产物用于qPCR，42°C孵育15 min。

3. 得到的cDNA产物可立即用于PCR/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-PCR/RT-qPCR

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

建议PCR条件

请按照选择的科尔普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：PC09-2×Taq PCR MasterMix 和 PC80-2×F8 FastLong PCR MasterMix
2. 高保真扩增：PC82-2×A8 FastHiFi PCR MasterMix 和 PC84-2×A8 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、引物和和RNase free H_2O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×TRUE 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，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5×TRUE 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。**