

# THERMOscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit



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](http://www.aidlab.cn) 邮箱：[info@aidlab.cn](mailto:info@aidlab.cn)

## 使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC4402	50次

Components	PC4402
5 × THERMO Reaction Mix	200 µl
Oligo(dT)(0.5 µg /µl)	50 µl
Random primer (N6)	50 µl
RNase free H <sub>2</sub> O	1 ml

产品储存：-20℃ 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<sup>-</sup> 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℃ 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。

**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. 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。
4. 预混合Mix在-20℃不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单。
5. 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

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)
RNase free H <sub>2</sub> O	to 20 µl (补足到总体积 20 µl)

### 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<sup>-</sup> RTase。

## 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: **PC09-2×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RNase free H<sub>2</sub>O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。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, 也不影响使用效果。**