

HotScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit (OneStep gDNA Removal)

使用说明书

包装量:

目录编号	包装单位
RT322-01	50 次*20uL
RT322-02	100 次*20uL

Components	RT322-01	RT322-02
5× HotScript Reaction Mix	200μL	400μL
gDNA Remover	50μL	100μL
Oligo(dT)(0.5μg/μL)	50μL	100μL
Random primer(N6)	50μL	100μL
RNase-free Water	1mL	1.5mL

产品储存: 4°C运输, -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× HotScript Reaction Mix(已经预混合了 HotScript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer)高效合成第一链 cDNA, 操作简单便捷。

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, 极大的简化了实验操作步骤, 避免了复杂加样过程中造成的污染与 RNA 降级的风险。

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15kb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，使用更简单便捷。
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poly A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采用先进的一步法基因组清除技术，最短时间、最简单便捷完成去除基因组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20μL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	50ng-5μg/5-500ng
Oligo(dT)(0.5μg /μL) or Random Primer(0.1μg/μL) or GSP(Gene Specific Primer, 2pmol/μL)	1μL

5× HotScript Reaction Mix	4μL(见注意事项 4)
gDNA Remover	1μL(见注意事项 4)
RNase-free Water	to 20μL(补足到总体积 20μL)

注：如果反转录时不需要去基因组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HotScript 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(2-4μL)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：请按照选择的爱普科学PCR试剂或者其它厂家PCR试剂说明书进行。

建议爱普科学配套PCR试剂：

1. 常规扩增：GP112-AipMix 2× Taq PCR MasterMix(+Dye)

GP121-AipMix 2× F8 FastLong PCR MasterMix(+Dye)

2. 高保真扩增：GP122-AipMix 2× A8 FastHiFi PCR MasterMix(+Dye)

GP123-AipMix 2× A9 LongHiFi PCR MasterMix(+Dye)

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 Water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× HotScript Reaction Mix和gDNA Remover含甘油非常粘稠，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×

HotScript Reaction Mix内包含的酶均为过量，即使每次按照3.6μL-3.8μL使用，也不

影响使用效果。gDNA Remover每次按照0.8 μ L-0.9 μ L使用，也不影响使用效果。

=====

