TGIRT Reverse Transcriptase

使用前请仔细阅读说明书（仅供科研实验使用）
保存：-20℃避光，一年

TGIRT 逆转录酶是一种比逆转录病毒逆转录酶热稳定性、持续能力和保真度更高的逆转录酶，允许从高度结构化或严格修饰的 RNA 进行全长的端到端 cDNA 合成。该酶具有依赖于 DNA/RNA 杂交链的反转录酶活性，能快速合成 cDNA，以及具有强的链转换活性（Switch）。可用于 tRNA、ncRNA、miRNA 等核酸分子的同步逆转录和加接头（TGIRT template-switching reaction，用于 TGIRT-Seq）、利用 RNA 的 5’端帽结构进行 SMART 建库（SAMRT-Seq）等。该酶的反应温度为 37-60℃，最佳反应温度为 50-60℃。

产品组成

组分名称	TRT-01
5×TGIRT Buffer	1 mL
TGIRT RTase	50 μL
100 mM DTT	0.5 mL

使用方法

Template-switching 反应如下：（TGIRT RTase 最后加入）

组分	体积（μL）
5×TGIRT Buffer	4
100 mM DTT	1
RNA	< 100 nM
1 μM Annealed DNA/RNA duplex	2
RI（自备）	40 U
TGIRT RTase（10 μM）	1
RNase Free Water	加至 19 μL

室温孵育 30 min 后，加入 1 μL 的 25 mM dNTP 后，于 37-60℃（推荐温度为 50-60℃）条件下反应 5-60min（通常 15min）。

失活：反应结束后，向反应体系中加入 1 μL 的 5N NaOH，并置于 95℃下加热 3min，失活该酶。失活后加入 5N HCl 中和高碱性条件。

应用

1. 链特异性转录组分析。

去核糖片段化通用人类参考 RNA 样品的 TGIRT-seq 概括了人类转录物和刺突蛋白的相对丰度，与非链特异性 TruSeq V2 相当，且优于链特异性 TruSeq V3。TGIRT-seq 比 TruSeq V3 具

有更强的链特异性，并消除了 TruSeq 固有的随机六聚体引发的取样偏差。与 TruSeq 相比，TGIRT-seq 显示了更均匀的 5’至 3’基因覆盖范围，并识别了更多的剪接点。TGIRT-seq 能够在相同的 RNA-seq 中同时分析 mRNA 和 IncRNAs，作为结构化的小 ncRNAs，包括 tRNA，它们基本上不存在于 TruSeq 数据集。

2. 全细胞或无细胞转录组测序；在诸如 RIP-seq、HITS-CLIP、irCLIP、CRAC、核糖体分析等方法中通过 TGIRT 模板转换构建 RNA-seq 文库。

处理时间短（通过 PCR 步骤构建 RNA-Seq 文库＜5 小时）；需要 RNA 少（低至 ng 范围）；全面的转录谱，包括 mRNAs 和 IncRNAs 以及小 ncRNA，包括 tRNAs、前 miRNAs 和其他结构化小 ncRNA 的全长阅读；不需要 RNA 连接酶；与常规方法相比，偏差更小，效率更高，链特异性更强。

3. 高度结构化和/或高度修饰的 RNA 模板的 RNA-seq。

更高的热稳定性、持续性和链置换使得获得 tRNAs 和其他结构化或修饰的小 ncRNAs 的全长、端到端 cDNAs 成为可能，逆转录病毒 RT 酶无法做到。

4. 人血浆和大肠杆菌基因组 DNA 的 ssDNA 序列分析。

通过直接在 DNA 链的 3’端启动 DNA 合成，同时连接 DNA-seq 衔接子，无需末端修复、加尾或连接，以更简单的工作流程捕获精确的 DNA 末端。能够分析核小体定位、转录因子结合位点、DNA 甲基化位点和来源组织。