

HiFiScript cDNA Synthesis Kit

项目号: H665509

保存条件: -20°C

产品内容

Component	H665509-100T
HiFiScript, 200U/ μ l	100 μ l
5 \times RT Buffer	500 μ l
Primer Mix	240 μ l
dNTP Mix, 2.5mM Each	500 μ l
DTT, 0.1M	240 μ l
RNase-Free Water	1ml

产品简介

本产品是专为两步法RT-PCR第一步实验配制的cDNA第一链合成试剂盒。该试剂盒中使用的HiFiScript逆转录酶是M-MLV由来的新型高效逆转录酶，新颖突变位点大幅提升酶的转录活性，cDNA第一链合成的效率和产量更高，可利用pg级的总RNA或mRNA合成cDNA第一链。点突变消除RNase H活性，酶的延伸性能提高，有效改善逆转录酶与RNA模板的亲合力，可获得长至12kb的cDNA。精心优化的RT Buffer使逆转录酶应用范围更广，对后续的PCR以及定量PCR实验兼容性好。该试剂盒配备所有逆转录试剂，使用简单方便。适用于第一链cDNA的合成和后续的RT-PCR、RT-qPCR，以及全长cDNA文库的构建等。

产品特点

1. 高效的逆转录效率：新颖突变位点大幅提升酶活性能，获得更高产量的cDNA。
2. 良好的延伸能力：点突变消除RNase H活性，改善逆转录酶与RNA模板的亲合力，可获得长至12kb的cDNA。
3. 灵敏度高：可利用pg级的总RNA或mRNA模板合成cDNA第一链。
4. 使用方便：逆转录试剂盒中已配备所有逆转录试剂，仅需准备模板即可轻松完成逆转录。

注意事项

1. 在操作过程中应避免RNase污染，防止RNA降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行RNA操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37°C处理12小时，并在120°C下高压灭菌30分钟后使用，或者将玻璃器皿在180°C下干热灭菌60分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用0.1%的DEPC处理后进行高压灭菌。
3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20°C，避免反复冻融。若起始RNA的量小于50ng，建议加入RNA酶抑制剂（RNasin）。

使用方法

注意：1ng-5 μ g总RNA可建立20 μ l反应体系，如果总RNA量大于5 μ g，请按比例扩大反应体系。

逆转录操作步骤：

1. 将RNA模板、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFiScript和RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。

2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为20 μ l。

试剂	20 μ l 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5mM Each	4 μ l	500 μ M Each
Primer Mix	2 μ l	
RNA Template	X μ l	
5 \times RT Buffer	4 μ l	1 \times
DTT, 0.1M	2 μ l	10mM
HiFiScript, 200U/ μ l	1 μ l	
RNase-Free Water	up to 20 μ l	

注意：1) 若起始RNA的量小于50ng，则建议加入RNA酶抑制剂（RNasin）。

2) Primer Mix由Oligo(dT)和Random Primer配制而成。

3. 涡旋震荡混匀，短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

4. cDNA合成反应条件：

1) 若下游进行荧光定量PCR检测，42 $^{\circ}$ C孵育15分钟，85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

2) 若下游进行普通PCR检测，42 $^{\circ}$ C孵育30-50分钟，85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

注意：对于二级结构复杂或GC含量高的模板，可以提高逆转录温度至50 $^{\circ}$ C，增强逆转录效率。

5. 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。

6. 逆转录产物可直接用于PCR反应和荧光定量PCR反应，或置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。

若逆转录效率低，或RNA模板二级结构复杂、GC含量高时，建议采用以下步骤：

1. 将RNA模板、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFiScript和RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。

2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为13 μ l。

试剂	20 μ l 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5mM Each Primer Mix	4 μ l	500 μ M Each
RNA Template	2 μ l X μ l	
RNase-Free Water	up to 13 μ l	50pg-5 μ g

3. 70 $^{\circ}$ C孵育10分钟，迅速冰浴2分钟。

4. 短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

5. 继续向以上反应液中加入以下试剂：

试剂	20 μ l 反应体系	终浓度
5 \times RT Buffer	4 μ l	1 \times
DTT, 0.1M	2 μ l	10mM
HiFiScript (200U/ μ l)	1 μ l	

注意：1) 若起始RNA的量小于50ng，则建议加入RNA酶抑制剂（RNasin）。

2) Primer Mix由Oligo(dT)和Random primer配制而成。

6. 进行cDNA第一链合成：

1) 若下游进行荧光定量PCR检测，50 $^{\circ}$ C孵育15分钟，85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

2) 若下游进行普通PCR检测，50 $^{\circ}$ C孵育30-50分钟，85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

7. 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。

8. 逆转录产物可直接用于PCR反应和荧光定量PCR反应，加入量应小于PCR反应体系的1/10，或置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。