

# HiFi-MMLV cDNA Kit

## HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒

项目号: H665693 (100 rxn)

保存条件: -20°C

### 产品内容

组分	H665693 100 rxn
HiFi-MMLV, 200 U/μl	100 μl
5×RT Buffer	500 μl
Primer Mix	240 μl
dNTP Mix, 2.5 mM Each	500 μl
DTT, 0.1 M	240 μl
RNase-Free Water	1 ml

### 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。本产品包含从 RNA 模板逆转录成 cDNA 第一链所需的所有试剂，其中包括 HiFi-MMLV 逆转录酶、反应缓冲液、引物、dNTP 等。经过突变改造的 HiFi-MMLV 逆转录酶 RNase H 活性缺失，减少了逆转录反应中 RNA 的降解，更容易获得全长的 cDNA。HiFi-MMLV 逆转录酶热稳定性强，可得高产量的 cDNA，使用简单方便。本系统对后续的 PCR 以及定量 PCR 试验兼容性强，适用各种 PCR 反应的 DNA 聚合酶。

### 产品特点

- RNase H-: 经突变的 HiFi-MMLV 逆转录酶，RNase H 活性缺失，更易获得全长 cDNA。
- 使用方便: 试剂盒包含除 RNA 模板外的逆转录所需全部试剂。

**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℃ 处理 12 小时，并在 120℃ 下高压灭菌 30 分钟后使用，或者将玻璃器皿在 180℃ 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℃，避免反复冻融。
4. 若起始 RNA 的量小于 50 ng，建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供。

**使用方法**

**注意：**10 ng-5 μg 总 RNA 可建立 20 μl 反应体系，如果总 RNA 量大于 5 μg，请按比例扩大反应体系

**i 逆转录操作步骤：**

1. 将 RNA 模板、引物、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFi-MMLV 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 μl。

试剂	20 μl 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 μl	500 μM Each
Primer Mix	2 μl	/
RNA Template	X μl	1 ng-5 μg
5×RT Buffer	4 μl	1×
DTT, 0.1 M	2 μl	10 mM
HiFi-MMLV, 200 U/μl	1 μl	/
RNase-Free Water	up to 20 μl	/

**注意：**

- 1) 若起始 RNA 的量小于 50 ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供。
- 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. 42℃孵育 30-50 分钟，85℃孵育 5 分钟。反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。
5. 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℃长期保存。

ii 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、引物、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFi-MMLV 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  $\mu$ l 。

试剂	20 $\mu$ l 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 $\mu$ l	500 $\mu$ M Each
Primer Mix	2 $\mu$ l	/
RNA Template	X $\mu$ l	1 ng-5 $\mu$ g
RNase-Free Water	up to 13 $\mu$ l	/

3. 70℃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 $\mu$ l 反应体系	终浓度
5 $\times$ RT Buffer	4 $\mu$ l	1 $\times$
DTT, 0.1 M	2 $\mu$ l	10 mM
HiFi-MMLV, 200 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	/

**注意：**

- 1) 若起始 RNA 的量小于 50 ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供。
- 2) Primer Mix 由 Oligo (dT) 和 Random primer 配制而成。
6. 轻轻吹打混匀，42℃孵育 50 分钟，85℃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，或置于-20℃长期保存。