

HiFiScript cDNA Synthesis Kit

货号	规格
AD502A	100 次

适用范围:

cDNA 合成

组分:

HiFiScript, 200U/ul	100ul
5×RT Buffer	500ul
Primer Mix	240ul
dNTPs, 2.5mM	500ul
Rnase-free Water	1ml
DTT, 0.1M	240ul

保存条件: -20℃ 保存

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 实验兼容性高。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

- 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。
- 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。

使用方法

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

1. 逆转录操作步骤:

- 将 RNA 模板、Primer Mix、dNTPs、DTT、RT Buffer、HiFiScript 和 Rnase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
- 根据以下表格配制反应体系, 总体积为 20ul。

试剂	20ul 反应体系	终浓度
dNTPs, 2.5 mM	4ul	500uM
Primer Mix	2ul	
RNA Template	Xul	50 pg-5ug
5×RT Buffer	4ul	1×
1× DTT, 0.1M	2ul	10 mM
HiFiScript, 200 U/ul	1ul	
Rnase-Free Water	up to 20ul	

注意: a. 若起始 RNA 的量小于 50 ng, 则建议加入 RNA 酶抑制剂。本试剂盒并未提供。

b. 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:

- a. 若下游进行荧光定量 PCR 检测, 42°C 孵育 15 分钟, 85°C 孵育 5 分钟。
- b. 若下游进行普通 PCR 检测, 42°C 孵育 30-50 分钟, 85°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°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°C 长期保存。

2. 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、dNTPs、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 13ul。

试剂	20ul 反应体系	终浓度
dNTPs, 2.5 mM	4ul	500uM
Each Primer Mix	2ul	
RNA Template	Xul	50 pg-5ug
Rnase-Free Water	up to 13ul	

3) 70°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	20ul 反应体系	终浓度
5×RT Buffer	4ul	1x
1× DTT, 0.1 M	2ul	10mM
HiFiScript, 200 U/ul	1ul	

6) 进行 cDNA 第一链合成:

- a. 若下游进行荧光定量 PCR 检测, 50°C 孵育 15 分钟, 85°C 孵育 5 分钟。
- b. 若下游进行普通 PCR 检测, 50°C 孵育 30-50 分钟, 85°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°C 长期保存。