


Hieff NGS[®] C37P3 ds-cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)

13501ES

产品使用说明书

Ver. CN20250113

A large, decorative orange wavy shape at the bottom of the page, consisting of several overlapping, rounded, wave-like forms in various shades of orange, creating a modern and dynamic background element.

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
储存条件	1
注意事项	1
使用说明	2

产品简介

Hieff NGS® C37P3 ds-cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)是用于 Illumina®/MGI®测序平台的 RNA 测序文库的 cDNA 合成试剂盒，包含 gDNA 去除试剂，RNA 反转录试剂，ds-cDNA 合成试剂。本试剂盒提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

产品信息

货号	13501ES08 / 13501ES24 / 13501ES96
规格	8 T / 24 T / 96 T

组分信息

组分编号和名称		13501ES08	13501ES24	13501ES96
13501-A	○ DNase I Buffer	16 μL	48 μL	192 μL
13501-B	○ DNase I Mix	16 μL	48 μL	192 μL
13501-C	● 1st Reaction Buffer	48 μL	144 μL	580 μL
13501-D	● 1st Strand Enzyme Mix	16 μL	48 μL	192 μL
13501-E	● 2nd Reaction Buffer	56 μL	168 μL	672 μL
13501-F	● 2nd Strand Enzyme Mix	24 μL	72 μL	288 μL

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

注意事项

一. 关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
3. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
4. 请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用 ThermoFisher 公司的 RNAZap™ 高效核酸去除喷雾去除 RNA 酶污染。
5. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁（推荐使用 ThermoFisher 公司的 DNAZap™ 高效核酸去除喷雾），以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅作科研用途！

二、自备材料

1. 文库质检: Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品; 文库定量试剂。
2. 其他材料: 无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等

使用说明

Step 1 gDNA 消化

1. 将 gDNA 消化反应试剂室温解冻后, 颠倒混匀, 置于冰上备用。按照表 1 所示配置 gDNA 消化反应液:

表 1 gDNA 消化反应体系

名称	体积 (μL)
DNase I Buffer	2
DNase I Mix	2
RNA	X
RNase-free H ₂ O	13-X
Total	17

2. 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 2 所示设置反应程序, 进行 gDNA 消化。

表 2 gDNA 消化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
37°C	15 min
94°C	7 min
4°C	Hold

Step 2 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis)

1. 将第一链合成试剂从 -20°C 取出, 室温解冻, 颠倒混匀后瞬离。按表 3 所示, 配制第一链 cDNA 合成的反应液。

表 3 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
RNA (gDNA digester plus)	17
1st Reaction Buffer	6
1st Stand Enzyme Mix	2
Total	25

2. 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 4 所示设置反应程序, 进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

表 4 第一链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	Hold

Step 3 第二链 cDNA 的合成 (2nd Strand Synthesis)

1. 将第二链合成试剂从-20 °C 取出，解冻后颠倒混匀；按照表 5 所示，配制第二链 cDNA 合成反应液。

表 5 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
1st Strand cDNA	25
2nd Reaction Buffer	7
2nd Stand Enzyme Mix	3
Total	35

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬间将反应液离心至管底。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 6 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 6 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖	Off
16°C	30 min
4°C	Hold

Step 4 cDNA 产物纯化

1. 2nd Strand cDNA 产物可衔接 Hieff NGS[®] C37P4 OnePot cDNA&gDNA Library Prep Kit “一步法” cDNA&gDNA 建库试剂盒进行文库构建，或者-20°C 保存。

2. 或者进行第二链 cDNA 产物纯化 (Post Ligation Clean Up)

1) 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2) 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

3) 吸取 63 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (1.8×, Beads:DNA=1.8:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。

4) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清。

5) 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6) 重复步骤 5)，总计漂洗两次。

7) 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。

8) 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后 (约 3 min)，小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中，进行后续反应，或者-20°C 保存。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐