

Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)

产品简介

Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)是含有 gDNA 去除步骤的 cDNA 第一链合成试剂盒。该试剂盒基于 Hifair® III Reverse Transcriptase 而开发。该酶 cDNA 合成速度快，且热稳定性大幅度提高，可耐受高达 60°C 的反应温度，适合具有复杂二级结构的 RNA 模板的逆转录。同时，该酶增强了与模板的亲合力，适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录。Hifair® III Reverse Transcriptase 合成全长 cDNA 的能力也有了提升，可合成长达 19.8 kb 的 cDNA。该试剂盒包含 gDNA digester Mix，可去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA 污染，保证后续结果更加可靠。该试剂盒提供两种 cDNA 合成引物：Random Primers N6 和 Oligo (dT)₁₈，用户可根据需要，选择 Random Primers N6，Oligo (dT)₁₈ 或 Gene Specific Primers 作为逆转录引物，合成的单链 cDNA 产物可直接用来进行后续 PCR 或者 qPCR 反应。

产品信息

货号	11139ES10 / 11139ES60
规格	10 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	11139ES10	11139ES60
11139-A	RNase-free H ₂ O	1 mL	2 × 1 mL
11139-B	5 × gDNA Digester Mix	30 μL	300 μL
11139-C	10 × Hifair® III Super Buffer*	20 μL	200 μL
11139-D	Hifair® III RT Enzyme Mix**	10 μL	100 μL
11139-E	Random Primers N6 (50 μM)	10 μL	100 μL
11139-F	Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	10 μL	100 μL

*10 × Hifair® III Super Buffer 包含 gDNA digester 抑制剂和 dNTPs。

** Hifair® III RT Enzyme Mix 包含 RNase inhibitor。

储存条件

-25~-15°C避光储存，有效期 18 个月。

使用说明

1.关于逆转录引物的选择

- 1) 如果模板为真核生物来源，建议选择 Oligo (dT)₁₈，与真核生物 mRNA 的 3' Poly A 尾配对，可获得最高产量的全长 cDNA。
- 2) 原核生物 RNA 的逆转录请选用 Random Primers N6 或者基因特异性引物。
- 3) Random Primers N6 适用性较广，适用于 mRNA、rRNA、tRNA、small RNA 和 LncRNA 等模板。

2. 第一链 cDNA 合成操作步骤

1) 若实验需要去除残留基因组 DNA

a. gDNA 消化

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液，用移液器轻轻吹打混匀。42°C 孵育 2 min。

组分	使用量
RNase-free H ₂ O	To 15 μL
5×gDNA Digester Mix	3 μL
Total RNA	10 pg-5 μg*
or mRNA	10 pg-500 ng*

表 1 gDNA 消化体系*

*若后续实验为 qPCR，Total RNA 投入量为 10 pg -1 μg；mRNA 的投入量为 10 pg-100 ng。若基因的表达丰度很低，最多可投入 5 ug Total RNA 或 500 ng mRNA。

b. 逆转录反应体系配制 (20 μL 体系)

组分	使用量
上一步的反应液	15 μL
10×Hifair® III Super Buffer	2 μL
Hifair® III RT Enzyme Mix	1 μL
Random Primers N6 (50 μM)	1 μL
or Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	or 1 μL
or Gene Specific Primer (2 μM)	or 1 μL
RNase-free H ₂ O	to 20 μL

表 2 逆转录体系(以 20 μL 为例)*

*使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

- 1) 逆转录引物：后续进行 qPCR 时，推荐 Random Primers N6 与 Oligo (dT)₁₈ 1:1 混合使用。
- 2) 建议先加入 10×Hifair® III Super Buffer 混匀后再添加逆转录引物，以保证完全抑制 gDNA digester 的活性。
- 3) 体系配制完成后，请用移液器轻轻吹打混匀。

c. 逆转录标准程序设置

温度	时间
25°C	5 min
55°C	15 min
85°C	5 min

表 3 逆转录标准程序*

*标准程序设置建议。

- 1) 逆转录温度：推荐使用 55°C。对于高 GC 含量模板或者复杂模板，可将逆转录温度提高到 60°C。
- 2) 逆转录时间：后续进行 qPCR 时，推荐 15 min；若后续用于 PCR 时，推荐 30 min-60 min。

d. 逆转录快速程序设置

温度	时间
55°C	15 min
85°C	5 sec

表 4 逆转录快速程序*

*逆转录快速程序适用于中低 GC 含量 (≤55%) 或者常规模板后续的荧光定量实验。

e. 产物保存

逆转录产物可以-20°C短期保存, 若需长期保存, 建议分装后, 于-80°C保存, 避免反复冻融。

2) 若实验无需去除残留基因组 DNA

a. RNA 模板变性

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液, 用移液器轻轻吹打混匀。65°C孵育 5 min, 迅速置于冰上, 并静置 3 min。

组分	使用量
RNase-free H ₂ O	To 17 μL
Total RNA	10 pg -5 μg
or mRNA	10 pg-500 ng
Random Primers N6 (50 μM)	1 μL
or Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	or 1 μL
or Gene Specific Primer (2 μM)	or 1 μL

表 5 RNA 模板变性体系

b. 逆转录反应体系配制 (20 μL 体系)

组分	使用量
上一步的反应液	17 μL
10×Hifair® III Super Buffer	2 μL
Hifair® III RT Enzyme Mix	1 μL

表 6 逆转录体系(以 20 μL 为例)*

c. 逆转录标准程序设置

温度	时间
25°C	5 min
55°C	15 min
85°C	5 min

表 7 逆转录标准程序*

*标准程序设置建议。

- 1) 逆转录温度: 推荐使用 55°C。对于高 GC 含量模板或者复杂模板, 可将逆转录温度提高到 60°C。
- 2) 逆转录时间: 后续进行 qPCR 时, 推荐 15 min; 若后续用于 PCR 时, 推荐 30 min-60 min。

d. 逆转录快速程序设置

温度	时间
55°C	15 min
85°C	5 sec

表 8 逆转录快速程序*

*逆转录快速程序适用于中低 GC 含量 (≤55%) 或者常规模板后续的荧光定量实验。

e. 产物保存

逆转录产物可以-20°C短期保存, 若需长期保存, 建议分装后, 于-80°C保存, 避免反复冻融。

3) miRNA 第一链 cDNA 茎环法合成操作步骤

a. gDNA 消化

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液, 用移液器轻轻吹打混匀。42°C 孵育 2 min。

组分	使用量
RNase-free H ₂ O	To 15 μL
5×gDNA Digester Mix	3 μL
Total RNA	10 pg -5 μg

表 9 gDNA 消化体系

b. miRNA 逆转录反应体系配制 (20 μL 体系)

组分	使用量
上一步的反应液	15 μL
10×Hifair® III Super Buffer	2 μL
Hifair® III RT Enzyme Mix	1 μL
Gene Specific Primer (10 μM)	1 μL
RNase-free H ₂ O	to 20 μL

表 10 miRNA 逆转录体系(以 20 μL 为例)*

*1) 建议先加入 10×Hifair® III Super Buffer 混匀后再添加逆转录引物, 以保证完全抑制 gDNA digester 的活性。

*2) 体系配制完成后, 请用移液器轻轻吹打混匀。

c. miRNA 逆转录标准程序设置

温度	时间
25°C	5 min
55°C	15 min

85°C	5 min
------	-------

表 11 miRNA 标准扩增程序*

*a. 逆转录时间：后续进行 qPCR 时，推荐 15 min；若后续用于 PCR 时，推荐 30 min-60 min。

注意事项

1. 反应液的配制应在冰上操作完成，操作过程应避免 RNase 污染。
2. 建议 RNA 是溶于水而不是 TE 中，因为 TE 会干扰 gDNA 去除以及逆转录反应。
3. 5×gDNA digester Mix、10×Hifair® III Super Buffer、Hifair® III RT Enzyme Mix 使用前请轻轻上下颠倒混匀，并小心离心至底部。吸取液体时请使用量程合适的移液器，枪头不要插入液面下过深。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
5. qPCR 实验推荐基因组去除步骤，保证结果更加真实可靠。
6. 本产品仅作科研用途！