

HyperScript™ III 1st Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Remover

货号: R201

保存条件: -20 °C长期储存

产品介绍:

本品为以RNA为模板合成1st Strand cDNA的试剂盒, 包含gDNA去除和逆转录两个部分。通过使用不同的逆转录引物本试剂盒既可以合成全长cDNA用于克隆, 又可以合成高度均一的cDNA用于qPCR定量。gDNA remover可以快速去除RNA样本中残留的基因组DNA, 而其活性被随后加入组分抑制, 保证了新合成的cDNA不被降解。试剂盒所使用的逆转录酶是基于M-MLV定向进化而来的新一代逆转录酶, 具有更低的RNase H活性、更高的热稳定性和cDNA合成效率, 搭配为其优化的最适buffer, 可以获得15k以上的全长cDNA。

产品组成:

组分	R201-02 (100个反应)
5 × gDNA remover	200 μL
5 × RT Mix	400 μL
HyperScript™ III Enzyme Mix	200 μL
Oligo (dT) ₂₀ VN	100 μL
Random Primers	100 μL
RNase-free ddH ₂ O	1.5 mL

温馨提示:

- 5x RT Mix 若出现白色沉淀, 请颠倒混匀确保沉淀完全溶解后使用。
- 为保证实验成功率和准确性, 请勿使用过度降解的RNA。
- 配置反应液时, 请使用RNase-free枪头、Microtube等。
- 若后续为定量PCR(qPCR), 逆转录15 min; 若后续为克隆实验, 逆转录45 min。

产品使用:**1.RNA热变性 (可选,5kb以上片段克隆为必须步骤)**

请配置如下反应液:

Total RNA	1 ng - 5 μg
RNase-free ddH ₂ O	补足至 8 μL

70°C处理5min后立即冰浴2min。

注: 热变性处理RNA, 可以打开RNA的高级结构, 有利于后续逆转录反应。若后续实验为PCR, 且目的片段大于5k, 不可省略该步骤。如果加入的为mRNA: 10 pg - 500 ng。

2.gDNA去除体系配置及反应程序

若选择步骤1, 在上述混合液中加入2 μL 5 × gDNA remover 混匀后42°C 2min;

若省略步骤1, 请配置如下反应液, 混匀后42°C 2 min。

RNA/mRNA	1 ng - 5 μg/10 pg - 500 ng
5 × gDNA remover	2 μL
RNase-free ddH ₂ O	补足至 10 μL

3. 配置逆转录反应体系

请配置如下反应液：

	真核生物mRNA 后续为克隆全长	真核生物mRNA 后续为qPCR	原核生物RNA	使用基因 特异性引物
步骤2反应液	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
5 \times RT Mix	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
HyperScript™ III Enzyme Mix	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Oligo (dT) ₂₀ VN*	1 μ L	1 μ L	/	/
Random Primers*	/	1 μ L	1 μ L	/
Gene Specific Primers*	/	/	/	2 pmol(1 μ M,2 μ L)
RNase-free ddH ₂ O	补足至20 μ L	补足至20 μ L	补足至20 μ L	补足至20 μ L

注：1. 后续实验为克隆实验，若RNA来源于真核生物，只需使用Oligo (dT)₂₀VN即可，加入Random Primers会降低全长cDNA的产量；

若RNA来源于原核生物，只需使用Random Primers 或基因特异性引物(2pmol)。

2. 后续实验为qPCR，请同时加入Oligo(dT)₂₀VN和Random Primers以获得在mRNA不同位置逆转录效率均一的cDNA。

4. 逆转录反应程序

请按如下条件进行逆转录反应：

25°C*	5 min
37°C*(高GC模板请使用50°C)	45min (克隆实验) 或者 15min for qPCR
85°C	5 sec

注：1. 25°C 5min有助于Random Primers与RNA结合，若不使用Random Primers该步骤可省略。

2. 若后续实验为克隆实验，逆转录45min即可产生大量的全长cDNA；若后续实验为qPCR，逆转录15min即可。

3. HyperScript™ III 在37-60°C均有较强活性，37°C即可满足绝大多数实验；若目标RNA区域有高GC部分，可提高逆转录温度至50°C。

4. 85°C 5s 可以失活逆转录酶和gDNA remover，请勿省略该步骤。

逆转录产物可直接用于下游实验，也可置于4°C短暂放置，3-6个月内-20°C保存，长期存放请置于-80°C冰箱，cDNA小份分装避免反复冻融。

常见问题及解决方案：

问题	解决方案
cDNA产量低	可以通过琼脂糖电泳检测RNA完整度，严重降解的RNA不适合获得完整的cDNA。 RNA投入量严重不足，请确保RNA定量准确。 逆转录引物使用不当。
逆转录引物如何选择	根据不同的实验目的进行选择。下面列举几种常见应用场景： 1. 克隆全长的真核生物mRNA用于后续实验，选择只用Oligo(dT) ₂₀ VN。 2. 克隆真核生物mRNA的部分序列或真核生物的其他RNA，选择Random Primers或二者同时使用。 3. 克隆原核生物的RNA，选择使用Random Primers。 4. 使用qPCR定量目的RNA，选择同时使Oligo(dT) ₂₀ VN和Random Primers。