

HyperScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit

产品描述

HyperScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit是基于HyperScript™ Reverse Transcriptase (Cat. No. K1071) 从 Total RNA或Poly(A)⁺RNA合成第一链cDNA的试剂盒。HyperScript™ Reverse Transcriptase是在M-MLV (RNase H⁻) Reverse Transcriptase基础上经过基因工程改造后获得的全新逆转录酶, 相较而言HyperScript™ Reverse Transcriptase降低了RNase H活性且大幅度提高了热稳定性。HyperScript™ Reverse Transcriptase可耐受更高的反应温度, 适用于具有复杂二级结构的RNA模板的逆转录。此外, HyperScript™ Reverse Transcriptase增强了与模板的亲和力, 适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录, 可合成长达12.3 kb的第一链cDNA。

HyperScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit包含合成第一链cDNA所需的所有组分, 并提供Random Primers和Oligo (dT)₂₃VN 两种cDNA合成引物。可根据实验需要选择Random Primers、Oligo (dT)₂₃VN或基因特异性引物作为逆转录引物, 合成的第一链cDNA产物可用于后续的PCR扩增、qPCR反应等实验。

产品组分及储存条件

Components	20 rxns (20 µl reaction)	50 rxns (20 µl reaction)	100 rxns (20 µl reaction)
HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/µl)	20 µl	50 µl	100 µl
5X First-Strand Buffer	80 µl	200 µl	400 µl
RNase Inhibitor, Murine(40 U/µl)	20 µl	50 µl	100 µl
10 mM dNTP Mixture	20 µl	50 µl	100 µl
RNase-free Water	1 ml	1 ml	2 × 1 ml
Random Primers (50 µM)	20 µl	50 µl	100 µl
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 µM)	20 µl	50 µl	100 µl

所有组分-20°C 保存.

第一链cDNA合成步骤

1. RNA 变性: 在 RNase-free 的 PCR 管中配制如下混合液: 65°C 加热 5 min, 反应结束迅速置于冰上冷却 2 min, 短暂离心。

Component	Volume
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 µM) or Random Primers (50 µM) or Gene Specific Primers (2 µM)	1 µl
Total RNA (1 pg to 5 µg) or Poly(A) ⁺ RNA (1 pg to 500 ng)	X µl
10 mM dNTP Mixture	1 µl

RNase-free Water

Up to 10 μ l

***Note:** RNA 变性步骤可选，RNA 变性有助于打开二级结构，提高逆转录效率；对长度超过 3 kb 的 cDNA 片段，请勿省略该步骤。

2. 按下表配制逆转录反应体系：

Component	Volume
上述变性后反应液	10 μ l
5X First-Strand Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor, Murine(40 U/ μ l)	1 μ l
HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l
RNase-free Water	Up to 20 μ l

3. 轻轻混匀上述反应物，瞬时离心，按下表设置逆转录程序：

Temperature	Time
25°C *a	2 min
42-50°C *b	50 min
75°C	15 min

***Note:**

- 如果使用的是 Random Primers，则需要设置此步骤；如果使用的是 Oligo (dT)₂₃VN 或 Gene Specific Primers 则可省略此步骤。
- HyperScript™ Reverse Transcriptase 对具有复杂二级结构的 RNA 模板仍具有良好的扩增能力，因此通常建议在 42°C 进行反应。当使用特异性下游引物进行逆转录时，可能会因错配而扩增出非特异性产物，此时可在 45-50°C 进行反应以便减少非特异性扩增。

4. 得到的逆转录产物可立即用于后续PCR或qPCR反应，也可分装后于-20°C短期保存，-80°C长期保存，避免反复冻融。

***Note:**

如果使用合成的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应，模板加入量会对 PCR 的扩增效率有影响，其加入量为 PCR 反应液量的 1/10 以下；在 RT-PCR 反应中，如果有非特异性扩增或无扩增产物时，可将第一链 cDNA 合成反应液用 RNase H 处理（如加入 1 μ l RNase H 到合成反应液 37°C 孵育 20 min）。

引物选择

- 如果模板来源于真核生物，建议选择 Oligo (dT)₂₃VN，该引物可与真核生物 mRNA 的 3' Poly(A)尾配对，获得最高产量的全长 cDNA；如果模板来源于原核生物，建议选择 Random Primers 或 Gene Specific Primers。
- 当后续实验为 qPCR 时，可以将 Oligo (dT)₂₃VN 与 Random Primers 1:1 混合使用，可提高 qPCR 结果的真实性和重复性。
- Random Primers 特异性最低、适用性较广，mRNA、rRNA、tRNA 和 LncRNA 等模板均可用 Random Primers 进行逆转录。一般 2 kb 以下的 cDNA 合成时 Random Primers 的使用量为 1-2 μ l；2 kb 以上的 cDNA 合成时 Random Primers 的使用量为 0.4-1 μ l。

4. 当模板具有复杂二级结构或 GC 含量较高时，使用 Oligo (dT)₂₃VN 或 Gene Specific Primers 无法有效引导 cDNA 合成时，可使用 Random Primers 为引物。
5. Gene Specific Primers 特异性最高。但有些情况下 Gene Specific Primers 无法有效引导第一链 cDNA 合成。可改用 Oligo (dT)₂₃VN 或 Random Primers 重新进行逆转录。

■ 注意事项

1. 实验在冰上操作，过程中避免 RNase 污染。
2. RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量，RNA 提取过程应注意防止 RNA 降解。



APEx BIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com

