

HyperScript™ First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (with gDNA wiper)

产品描述

HyperScript™ First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (with gDNA wiper) 是基于 HyperScript™ Reverse Transcriptase (货号: 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 增强了与模板的亲合力, 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 SuperMix (with gDNA wiper) 包含合成第一链 cDNA 所需的除引物以外的所有组分, 并提供 Random Primers 和 Oligo (dT)₂₃VN 两种 cDNA 合成引物。产品中包含的 4 × gDNA wiper 可在逆转录前快速彻底去除体系中潜在的基因组干扰。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

组分	50 rxns (20 µL reaction)	100 rxns (20 µL reaction)
RNase Free ddH ₂ O	1 mL	2 × 1 mL
5 × SuperMix	200 µL	400 µL
4 × gDNA wiper mix	190 µL	380 µL
Random Primers (50 µM)	50 µL	100 µL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 µM)	50 µL	100 µL
5 × control Mix	20 µL	40 µL
-20°C 保存。		

第一链 cDNA 合成步骤

1. 基因组 DNA 去除: 在 RNase free 的 PCR 管中配制如下混合液

组分	体积
RNase Free ddH ₂ O	Up to 15 µL
4 × gDNA wiper mix	3.75 µL
模板 RNA	Total RNA: 1 pg – 5 µg poly(A) mRNA: 0.1 pg – 500 ng

用移液器轻轻吹打混匀后进行孵育: 37°C 孵育 2-5min; 55°C 孵育 5min。

2. RNA变性：在RNase free的PCR管中配制如下混合液

组分	体积
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 μM) or Random Primers (50 μM) or Gene Specific Primers (2 μM)	1 μL
前一步反应产物	15 μL

注：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。

3. 65°C加热5 min，反应结束迅速置于冰上冷却2 min，短暂离心。

4. 按下表配制逆转录反应体系：

组分	体积
前一步反应产物	16 μL
5× SuperMix	4 μL

Control 反应(可选)

Control 反应是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应。若逆转录产物将用于后续 qPCR 实验，可用 Control 反应检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

组分	体积
RNase Free ddH ₂ O	Up to 20 μL
5× control Mix	4 μL
模板 RNA	Total RNA: 1 pg - 1 μg

5. 轻轻混匀上述反应物，瞬时离心，按下表设置逆转录程序：

温度	时间
25°C ^{*a}	2 min
42-50°C ^{*b}	50 min
75°C	15 min

注：a. 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。

b. HyperScript™ Reverse Transcriptase 对具有复杂二级结构的 RNA 模板仍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。

6. 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。

注：如果使用合成的第一链 cDNA 作为模板进行 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

1. 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。
2. 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。
3. 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