

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

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)	11121ES60	100 T

产品描述

Hifair® II 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® II Reverse Transcriptase 而开发。该酶热稳定性大幅度提高，可耐受高达 50°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® II Reverse Transcriptase 合成全长 cDNA 的能力也有了提升，可扩增长达 10 kb 的 cDNA。

该试剂盒包含 gDNA digester，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。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格
		11121ES60 (100 T)
11121-A	RNase-free H ₂ O	2×1 mL
11121-B	5×gDNA digester Buffer	200 μL
11121-C	gDNA digester	100 μL
11121-D	5×Hifair® II Buffer plus	400 μL
11121-E	Hifair® II Enzyme Mix	200 μL
11121-F	Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	100 μL
11121-G	Random Primers N6 (50 μM)	100 μL

【注】：1) 5×Hifair® II Buffer plus 包含 gDNA digester 抑制剂和 dNTP。

2) Hifair® II Enzyme Mix 包含 RNase inhibitor。

运输和保存方法

干冰运输。-20°C 保存，有效期 18 个月。

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) 可以不经过去基因组去除步骤，直接进行逆转录，这样所得到的结果与使用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Cat#11119) 效果一致。但是请勿将 gDNA digester 与 11119ES 中的 5×Hifair® II Buffer 配套使用，因其不含终止 gDNA 去除反应的成分，会影响反转录和后续的 qPCR 实验。
- 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) 本产品仅作科研用途！

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 的反转录请选用 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。
- 4) 使用 Random primers N6, 进行 2 kb 以下的 cDNA 合成时, Random primers N6 的使用量为 1-2 μL ; 2 kb 以上的 cDNA 合成时, Random primers N6 的使用量为 0.4-1 μL 。

第一链 cDNA 合成操作步骤

一、若实验需要去除残留基因组 DNA

1. 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 10 μL
5 \times gDNA digester Buffer	2 μL
gDNA digester	1 μL
Total RNA	1 ng -5 μg^*
or mRNA	1 ng-500 ng *

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

2. 逆转录反应体系配制 (20 μL 体系)

组分	使用量
RNase-free H ₂ O	To 20 μL
上一步的反应液	10 μL
5\times Hifair[®] II Buffer plus	2 μL^*
Hifair [®] II Enzyme Mix	2 μL
Random Primers N6 (50 μM)	1 μL
or Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	or 1 μL
or Gene Specific Primers (2 μM)	or 1 μL

【注】: 1) 逆转录引物: 荧光定量实验推荐 Random Primers N6 与 Oligo (dT)₁₈ 1:1 混合使用。

2) 5 \times Hifair[®] II Buffer plus 加入量 (*): 因 gDNA digester buffer 的影响, 本体系中只需要加 2 μL 。

3) 建议先加入 5 \times Hifair[®] II Buffer plus 混匀后再添加反转录引物, 以保证完全抑制 gDNA digester 的活性。

3. 逆转录程序设置

温度	时间
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min

【注】: 逆转录温度: 推荐使用 42°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 50°C。

4. 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。

二、若实验无需去除基因组 DNA

1. 逆转录反应体系配制 (20 μ L 体系)

组分	使用量
RNase-free H ₂ O	To 20 μ L
Total RNA or mRNA	1 ng -5 μ g 1 ng-500 ng
5\times Hifair[®] II Buffer plus	4 μL*
Oligo (dT) ₁₈ (50 μ M) or Random Primers N6 (50 μ M)	1 μ L
Hifair [®] II Enzyme Mix	2 μ L

【注】: 1) 逆转录引物: 荧光定量实验推荐 Random Primers N6 与 Oligo (dT)₁₈ 1:1 混合使用。

2) 5 \times Hifair[®] II Buffer plus 加入量 (*): 因无 gDNA digester buffer 的影响, 本体系中需要添加 4 μ L。

【可选步骤】: 针对复杂模板, 建议 RNA、H₂O、反转录引物在 65 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后, 冰上迅速冷却。然后再加入反转录酶和 Buffer。

2. 逆转录程序设置参照上述基因组去除后的逆转录程序。