

Hifair® V Reverse Transcriptase 第五代耐热逆转录酶(1000 U/μL)

产品信息

产品名称	产品编号	规格
	14603ES03	1,000 kU
Hifair® V Reverse Transcriptase 第五代耐热逆转录酶(1000 U/μL)	14603ES25	25,000 kU
	14603ES72	250,000 kU

产品描述

Hifair® V Reverse Transcriptase 是在 Hieff® M-MLV (H) Reverse Transcriptase 基础上通过基因工程技术得到的全新逆转录酶，与 Hieff® M-MLV (H) Reverse Transcriptase 相比，其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® V Reverse Transcriptase 合成全长 cDNA 的能力也有了提升，可扩增长达 10 kb 的 cDNA。

产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		14603ES03 (1,000 kU)	14603ES25 (25,000 kU)	14603ES72 (250,000 kU)
14603-A	Hifair® V Reverse Transcriptase (1000 U/μL)	1 mL	25 mL	250 mL

产品应用

一步法 RT-qPCR；基因克隆；荧光定量。

活性定义

以 Poly(A) .Oligo(dT) 为模板-引物，在 37°C，10 min 内，将 1 nmol 的 dTTP 掺入为酸不溶性物质所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

运输与保存方法

冰袋运输。-20°C 保存，有效期 2 年。

注意事项

- 1) 请保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用耗材均需保证 RNase free，以防止 RNase 污染；
- 2) 所有操作均应在冰上进行，防止 RNA 降解；
- 3) 为保证高效率逆转录，建议使用高质量的 RNA 样本；
- 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。

第一链 cDNA 合成操作步骤

1. RNA 变性（此步为可选步骤，RNA 变性有助于打开二级结构，可在很大程度上提高第一链 cDNA 的产量）

组分	使用量
RNase free ddH ₂ O	to 13 μ L
Oligo (dT) ₁₈ (50 μ M)	1 μ L
or Random Primers (50 μ M)	or 1 μ L
or Gene Specific Primers (2 μ M)	or 1 μ L
模板 RNA	Total RNA: 1 ng -5 μ g 或 mRNA:1-500 ng

65°C加热 5 min，迅速置于冰上冷却 2 min。简短离心收集反应液后，加入下表中的逆转录反应液，并轻轻吹打混匀。

2. 逆转录反应体系配制（20 μ L 体系）

组分	使用量
上一步的反应液	13 μ L
10 \times Hifair [®] V Buffer (Cat#15661)	2 μ L
dNTP Mix (10 mM)	1 μ L
Hifair [®] V Reverse Transcriptase (1000 U/ μ L)	0.2 μ L
RNase inhibitor (40 U/ μ L)	1 μ L
RNase free ddH ₂ O	to 20 μ L

3. 逆转录程序设置

温度	时间
25°C	5 min
42°C	15-30 min
85°C	5 min

【注】 1) 当使用 Random Primers 时，需 25°C，孵育 5 min；若使用 Oligo (dT)₁₈ 或 Gene Specific Primers，此步可省略。

2) 逆转录温度：推荐使用 42°C。对于高 GC 含量模板或者复杂二级结构的模板，可将逆转录温度提高至 50-55°C。

3) 85°C加热 5 min，目的是使逆转录酶失活。

※ 逆转录产物可立即用于后续 PCR 或 qPCR 反应，也可-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。

※ 该逆转录酶也适用于一步法 RT-qPCR，推荐每 25 μ L 反应体系，添加 10-20 U 逆转录酶，也可根据实际情况逐步增加逆转录酶用量。