

10 × Hifair® V Buffer

产品信息

产品名称	产品编号	规格
10 × Hifair® V Buffer	15661ES03	1 mL
	15661ES08	5 mL
	15661ES50	50 mL

产品描述

10 × Hifair® V Buffer 可与 Hifair® V Reverse Transcriptase (Cat#14603)配套使用，为逆转录反应创造最佳条件。

产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		15661ES03	15661ES08	15661ES50
15661-A	10 × Hifair® V Buffer	1 mL	5 mL	50 mL

产品应用

一步法 RT-qPCR；基因克隆；荧光定量。

运输与保存方法

冰袋运输。-20℃保存，有效期 3 年。

使用方法

本品在逆转录反应体系中终浓度为 1 × Hifair® V Buffer 即可。

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。

逆转录实验案例

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	2 μ L
dNTP Mix (10 mM)	1 μ L
Hifair® V Reverse Transcriptase (1000 U/ μ L) (Cat#14603)	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。