

5×Hifair[®] III Buffer

产品信息

产品名称	产品编号	规格
	15662ES03	1 mL
5×Hifair [®] III Buffer	15662ES08	5 mL
	15662ES50	50 mL

产品描述

5×Hifair[®] III Buffer 可与 Hifair[®] III Reverse Transcriptase (Cat#14601) 配套使用，为逆转录创造最佳条件。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		15662ES03	15662ES08	15662ES50
15662-A	5×Hifair [®] III Buffer	1 mL	5 mL	50 mL

产品应用

全长 cDNA 文库构建；终点法 PCR；实时定量 PCR 等。

运输与保存方法

冰袋运输。-20℃保存，有效期 1 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。
- 5) 本产品仅作科研用途！

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 H ₂ O	to 13 μL
Oligo (dT) ₁₈ (50 μM)	1 μL
or Random Primers (50 μM)	or 1 μL
or Gene Specific Primers (2 μM)	or 1 μL
模板 RNA	Total RNA: 10 pg -5 μg 或 mRNA:10 pg-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，并用移液器轻轻吹打混匀。

2. 逆转录反应体系配制（20 μL 体系）

组分	使用量
上一步的反应液	13 μL
5×Hifair® III Buffer	4 μL
dNTP Mix (10 mM)	1 μL
Hifair® III Reverse Transcriptase (800 U/μL) (Cat#14601)	200 U
RNase inhibitor (40 U/μL)	1 μL

3. 逆转录程序设置

温度	时间
25°C	5 min
55°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 55°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 60°C；

3) 可将逆转录时间延长到 45-60min，有助于提高产量；

4) 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。