HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit

R211-01/02

Version 5.1

Vazyme

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

HiScript® II Reverse Transcriptase是在M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase基础上通过体外分子进化技术获得的全新逆转录酶。与上一代的HiScript® Reverse Transcriptase相比，HiScript® II进一步大幅提高了热稳定性，在50˚C的半衰期超过240分钟，并可在55˚C长时间反应而保持稳定，非常适合具有复杂二级结构的RNA模板的逆转录。此外，HiScript® II增加了多个点突变，进一步增强了模板亲和力和行进性，使得全长cDNA的合成能力有了大幅度提升，可获得长达20 kb的cDNA，并且对于常见的逆转录抑制物具有更高的耐受度，非常适合于植物组织RNA的逆转录反应。

HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit包含合成高质量第一链cDNA所需的所有成分，适合于后续的PCR、qPCR以及PCR克隆。2 × RT Mix包含优化的缓冲体系和dNTP；HiScript® II Enzyme Mix包含HiScript® II Reverse Transcriptase和RNase inhibitor。Kit中附带的Oligo $dT_{23}VN$比Oligo $(dT)_{18}$对于Poly A^+ RNA的锚定能力更强，使得逆转录效率更高。用户可根据需要，选择Oligo $dT_{23}VN$、Random hexamers或基因特异引物作为逆转录引物。

产品组成

组　分	R211-01 50 rxn (20 μl/rxn)	R211-02 100 rxn (20 μl/rxn)
RNase free ddH_2O	1 ml	1 ml
2 × RT Mix [a]	500 μl	1 ml
HiScript® II Enzyme Mix [b]	100 μl	200 μl
Oligo $dT_{23}VN$ (50 μM)	50 μl	100 μl
Random hexamers (50 ng/μl)	50 μl	100 μl

a. 包含1 mM each dNTP
b. 包含RNase inhibitor

储存条件

-20˚C保存。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶，核酸内切酶，RNase残留。

功能检测1：以500 ng mouse total RNA为模板，Oligo $dT_{23}VN$为引物，50˚C反应45分钟。取1/10 cDNA产物进行PCR扩增nebulin基因。琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的20.0 kb条带。

功能检测2：以100 pg Hela cell total RNA为模板，Oligo $dT_{23}VN$为引物，50˚C反应30分钟。取1/10 cDNA产物进行PCR扩增β-actin基因。琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的550 bp条带。

功能检测3：以500 ng Hela cell total RNA为模板，Oligo $dT_{23}VN$为引物，55˚C反应45分钟。取1/10 cDNA产物进行PCR扩增Polε基因。琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的4.8 kb (GC-rich)条带。

功能检测4：以1 pg-1 μg HeLa cell total RNA为模板，以Oligo $dT_{23}VN$和Random hexamers为引物，测试qRT-PCR性能。以6个数量级的模板量的对数值对Ct值做标准曲线，R^2>0.990，斜率在-3.20到-3.60之间。

注意事项

防止RNase污染

请保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证RNase free。

引物选择

后续实验为PCR

- 如果模板为真核生物来源，一般情况下首选Oligo $dT_{23}VN$，与真核生物mRNA的3' Poly A尾配对，可获得最高产量的全长cDNA。

● 基因特异性引物 (GSP)的特异性最高。但有些情况下，用于PCR反应的GSP无法有效引导第一链cDNA合成。这时，可改用Oligo $dT_{23}VN$或Random hexamers重新进行逆转录。

● Random hexamers特异性最低，所有RNA，包括mRNA, rRNA, tRNA均可以作为Random hexamers的模板。当目标区域具有复杂二级结构或GC含量较高，或者模板为原核生物来源，使用Oligo $dT_{23}VN$或基因特异性引物 (GSP)无法有效引导cDNA合成时，可使用Random hexamers为引物。

后续实验为qPCR

● 将Oligo $dT_{23}VN$与Random hexamers混合使用，可使mRNA的各个区域均能以相同效率引发cDNA合成，有助于提高定量结果的重复性。

应用实例

1. 后续实验为PCR

a. RNA模板变性*

在RNase free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH_2O	to 8 μl
Oligo $dT_{23}VN$ (50 μM)	
or Random hexamers (50 ng/μl)	1 μl
or Gene Specific Primers (2 μM)	
Total RNA	10 pg-5 μg
or Poly A^+ RNA	10 pg-500 ng

65˚C 加热5 min，迅速置于冰上骤冷，并在冰上静置2 min。

*RNA模板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。对于长度超过3 kb的cDNA片段，请勿省略变性步骤。

b. 配制第一链cDNA合成反应液

上一步的混合液	8 μl
2 × RT Mix	10 μl
HiScript® II Enzyme Mix	2 μl

用移液器轻轻吹打混匀。

c. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

25 °C [a]	5 min
50 °C [b]	45 min
85 °C	5 min

a. 仅当使用Random hexamers时需要此步骤；使用Oligo $dT_{23}VN$或Gene Specific Primers时省略此步骤。

b. 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高至55°C，有助于提高产量。

产物可立即用于PCR反应，或在-20 °C保存,并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 °C保存。cDNA应避免反复冻融。

2. 后续实验为qPCR

a. 配制第一链cDNA合成反应液

在RNase free离心管中配制如下混合液：

RNase free ddH_2O	to 20 μl
2 × RT Mix	10 μl
HiScript® II Enzyme Mix	2 μl
Oligo $dT_{23}VN$ (50 μM)	1 μl
Random hexamers (50 ng/μl)	1 μl
Total RNA	10 pg-1 μg
or Poly A^+ RNA	10 pg-100 ng

用移液器轻轻吹打混匀。

b. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

25 °C	5 min
50 °C*	15 min
85 °C	5 min

* 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高至55°C，有助于提高产量。

产物可立即用于PCR反应，或在-20 °C保存,并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 °C保存。cDNA应避免反复冻融。