

HiScript® Reverse Transcriptase

R101-01/02



Version 5.1

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

HiScript® Reverse Transcriptase是在M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase基础上经过多点突变得到的全新逆转录酶。HiScript® Reverse Transcriptase在50°C下活性最高，且可耐受高达55°C的反应温度，可用于具有二级结构的RNA模板的逆转录。增强与模板的亲合力，可获得更多全长的cDNA，并可检测到低至1 pg的总RNA，特别适合少量模板以及低拷贝基因的逆转录。此外，HiScript® Reverse Transcriptase的错配率也比M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase有所降低，提高了克隆的保真度。

产品组成

组 分	R101-01 2,000 U	R101-02 10,000 U
5 × HiScript® Buffer	500 µl	500 µl
HiScript® Reverse Transcriptase (200 U/µl)	10 µl	50 µl

储存条件

-20°C保存。

单位定义

以Poly (rA)·Oligo (dT)为模板/引物，在37°C，10分钟条件下，掺入1 nmol的dTTP为酸不溶性物质所需要的酶量定义为1个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：200 U的本酶和0.6 µg λ-Hind III在37°C下孵育16小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：200 U的本酶和0.6 µg Supercoiled pBR322 DNA在37°C下孵育4小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

RNase残留检测：200 U的本酶和1 µg小鼠肝脏总RNA在37°C下孵育1小时，RNA电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：200 U本品中残留的核酸经*E.coli* 16s rDNA特异性的TaqMan qPCR检测，*E.coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测1：逆转录体系中加入200 U本酶，以500 ng HeLa cell total RNA为模板，Oligo (dT)₁₈为引物，50°C反应45分钟。取1/10 cDNA产物进行PCR扩增DNCH基因。琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的5.6 kb条带。

功能检测2：逆转录体系中加入200 U本酶，以100 pg HeLa cell total RNA为模板，Oligo (dT)₁₈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。

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，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 ₂ O	to 13 µl
Oligo (dT) ₁₈ (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, 迅速置于冰水浴骤冷, 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	13 µl
5 × HiScript [®] Buffer	4 µl
dNTP Mix (10 mM each)	1 µl
HiScript [®] Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase inhibitor (40 U/µl)	1 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)₁₈或Gene Specific Primer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 ₂ O	to 20 µl
5 × HiScript [®] Buffer	4 µl
dNTP Mix (10mM each)	1 µl
HiScript [®] Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase inhibitor (40 U/µl)	1 µl
Oligo (dT) ₁₈ (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

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。