

HiScript® II Reverse Transcriptase

R201-01/02



Version 5.1

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。

产品组成

组 分	R201-01 2,000 U	R201-02 10,000 U
5 × HiScript® II Buffer	500 µl	500 µl
HiScript® II 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: 以500 ng mouse total RNA为模板, Oligo dT₂₃VN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 dT₂₃VN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 dT₂₃VN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 dT₂₃VN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, R²>0.990, 斜率在-3.20到-3.60之间。

实验准备和指南

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 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	13 µl
5 × HiScript [®] II Buffer	4 µl
dNTP Mix (10 mM each)	1 µl
HiScript [®] II 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 dT₂₃VN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 [®] II Buffer	4 µl
dNTP Mix (10mM each)	1 µl
HiScript [®] II Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase inhibitor (40 U/µl)	1 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。