

HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)

R312-01/02

Version 10.1



Vazyme biotech co., Ltd.

产品概述

HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)是HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)的升级版，包含新一代逆转录酶HiScript® III Reverse Transcriptase和针对逆转录优化的最适Buffer，进一步提高了一链合成的效率。该试剂盒中的5 × gDNA wiper Mix可在42°C，2 min条件下快速去除基因组DNA污染，保证后续结果更加可靠，并可简化qPCR引物设计，无需跨内含子设计引物。试剂盒中包含单组分逆转录引物Oligo (dT)₂₀VN和Random hexamers，用户可根据需要，灵活选择逆转录引物进行后续实验。本试剂盒既可合成用于克隆等下游实验的全长cDNA (可达20 kb)，亦可合成高度均一的用于qPCR定量的cDNA。

产品组分

组 分	R312-01 50 rxn (20 µl/rxn)	R312-02 100 rxn (20 µl/rxn)
RNase-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml
5 × gDNA wiper Mix	100 µl	200 µl
10 × RT Mix ^a	100 µl	200 µl
HiScript III Enzyme Mix ^b	100 µl	200 µl
Oligo (dT) ₂₀ VN	50 µl	100 µl
Random hexamers	50 µl	100 µl

a. 包含dNTP

b. 包含RNase inhibitor

保存条件

-30 ~ -15°C保存。运输条件：≤0°C。

10 × RT Mix中含有高浓度DTT，低温下可能有沉淀析出。使用前请还原至室温并轻摇混匀，待沉淀重新溶解后使用。

质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及RNase残留。

功能检测1：在1 µg HeLa细胞总RNA中混入100 ng human genomic DNA，经gDNA wiper Mix处理后，进行两对质控引物的qRT-PCR，No RT Control的C_T值> 40。

功能检测2：以1 µg HeLa细胞总RNA为模板进行逆转录反应，通过PCR扩增3个不同长度的DNA片段(4.8 Kb、7.1 Kb、15 Kb)，目的条带单一且亮度在批次间的产品中相近。

功能检测3：以1 µg HeLa细胞总RNA为模板进行逆转录反应，通过qPCR检测4个基因的表达量，C_T值在批次间的产品中相近。

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)₂₀VN，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)₂₀VN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)₂₀VN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)₂₀VN与Random hexamers以指导比例混合使用，可使mRNA的各个区域cDNA合成效率相同，有助于提高定量结果的真实性重复性。
- 可以不经过基因组去除步骤直接进行逆转录，空余体积以RNase-free ddH₂O补足即可。

实验流程

◇后续实验为PCR

1. 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 8 μ l
Total RNA	10 pg - 5 μ g
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, 请勿省略此变性步骤。

2. 基因组DNA去除

上一步的混合液	8 μ l
5 × gDNA wiper Mix	2 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。42°C 2 min。

3. 配制第一链cDNA合成反应液

上一步的混合液	10 μ l
10 × RT Mix	2 μ l
HiScript III Enzyme Mix	2 μ l
Oligo (dT) ₂₀ VN	1 μ l
or Random hexamers	
RNase-free ddH ₂ O	5 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

* 该产品亦适用于基因特异性引物(GSP)引发的逆转录, 为避免gDNA wiper对GSP的潜在影响, 请在此步骤体系中加入基因特异性引物(2 pmol)。

4. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

25°C ^a	5 min
37°C ^b	45 min
85°C	5 sec

a. 仅当使用Random hexamers时需要此步骤; 使用Oligo (dT)₂₀VN或GSP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50°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-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

◇后续实验为qPCR

1. 基因组DNA去除

在RNase-free离心管中配制如下混合液:

RNase-free ddH ₂ O	to 10 μ l
5 × gDNA wiper Mix	2 μ l
Total RNA	10 pg - 1 μ g
or Poly A ⁺ RNA	10 pg - 100 ng

用移液器轻轻吹打混匀。42°C 2 min。

2. 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:

上一步的混合液	10 μ l
10 × RT Mix	2 μ l
HiScript III Enzyme Mix	2 μ l
Oligo (dT) ₂₀ VN	1 μ l
Random hexamers	1 μ l
RNase-free ddH ₂ O	4 μ l

用移液器轻轻吹打混匀。

* 该产品亦适用于基因特异性引物(GSP)引发的逆转录, 为避免gDNA wiper对GSP的潜在影响, 请在此步骤体系中加入基因特异性引物(2 pmol)。

3. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

37°C*	15 min
85°C	5 sec

* 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50°C, 有助于提高产量。

产物可立即用于qPCR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-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。



ISO 9001: 2015