

# HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)

R412

Version 23.1



## 产品概述

HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)是HiScript系列第四代一链cDNA合成试剂，可使用Total RNA或Poly A<sup>+</sup> RNA为模板合成第一链cDNA。相较于前代产品，HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)进一步提升了逆转录效率：包括更强的延伸能力、更快的反应速度以及更高的抑制物耐受程度，尤其适合下游qPCR定量反应和长片段cDNA扩增。本产品提前预混了HiScript IV RTase、RNase inhibitor、dNTP Mix等，使用时只需要根据下游实验添加适当的逆转录引物。本试剂盒提供基因组去除模块，试剂盒中的5 × gDNA wiper Mix可在42℃，2 min条件下快速去除基因组DNA污染，保证实验数据真实可靠。

## 产品组分

| 组 分  | R412-01 50 rxns (20 µl/rxn) | R412-02 100 rxns (20 µl/rxn) |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 1 ml                        | 1 ml                         |
| <input type="checkbox"/> 5 × gDNA wiper Mix            | 100 µl                      | 200 µl                       |
| <input type="checkbox"/> 4 × HiScript IV RT SuperMix*  | 250 µl                      | 500 µl                       |
| <input type="checkbox"/> Oligo (dT) <sub>20</sub> VN   | 50 µl                       | 100 µl                       |
| <input type="checkbox"/> Random Primers                | 100 µl                      | 200 µl                       |
| <input type="checkbox"/> 4 × No RT Control Mix         | 25 µl                       | 50 µl                        |

\*包含dNTP Mix和RNase inhibitor。

## 保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

## 适用范围

本产品广泛适用于动物、植物以及微生物RNA的逆转录反应。

## 注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

### ◇ 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)<sub>20</sub>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)<sub>20</sub>VN或Random Primers重新进行逆转录。
- Random Primers特异性最低，所有RNA，包括mRNA，rRNA，tRNA均可以作为Random Primers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)<sub>20</sub>VN或GSP无法有效引导cDNA合成时，可使用Random Primers作为引物。

#### 后续实验为qPCR

- 将Oligo (dT)<sub>20</sub>VN与Random Primers以说明书比例混合使用，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和重复性。
- 本试剂盒中提供的Oligo (dT)<sub>20</sub>VN和Random Primers经过特殊优化，请使用本试剂中提供的Oligo (dT)<sub>20</sub>VN和Random Primers，使用合成的或其他试剂提供的逆转录引物可能导致逆转录效率下降。
- 可以不经过基因组去除步骤直接进行逆转录，空余体积用RNase-free ddH<sub>2</sub>O补足即可。

## 实验流程

### ◇ 后续实验为PCR

#### 1. RNA模板变性

| 组 分                           | 体 积                              |
|-------------------------------|----------------------------------|
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | to 8 µl <input type="checkbox"/> |
| Total RNA                     | 10 pg - 5 µg                     |
| or Poly A <sup>+</sup> RNA    | 10 pg - 500 ng                   |

65℃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。

▲ 完整的RNA是合成长片段cDNA的前提，如无法保证RNA完整性，建议增大RNA投入量以增加完整RNA拷贝数，RNA投入量最多可增加至5 µg。

## 2. 基因组DNA去除

| 组 分                       | 体 积  |
|---------------------------|--|
| 上一步的混合液                   | 8 $\mu$ l                                      |
| 5 $\times$ gDNA wiper Mix | 2 $\mu$ l <span style="color: green;">■</span> |

用移液器轻轻吹打混匀。42 $^{\circ}$ C 2 min。

## 3. 配制第一链cDNA合成反应液

| 组 分                                | 体 积   |
|------------------------------------|---|
| 上一步的混合液                            | 10 $\mu$ l                                      |
| 4 $\times$ HiScript IV RT SuperMix | 5 $\mu$ l <span style="color: red;">■</span>    |
| Oligo (dT) <sub>20</sub> VN*       | 1 $\mu$ l <span style="color: purple;">■</span> |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O      | 4 $\mu$ l <input type="checkbox"/>              |

用移液器轻轻吹打混匀。

\*亦可使用GSP (2 pmol)或Random Primers进行逆转录。

## 4. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 50 $^{\circ}$ C | 5 min* |
| 85 $^{\circ}$ C | 5 sec  |

\*本试剂可在5 min内合成15 kb的cDNA，如需获得更多的cDNA产物，可将反应时间延长至30 min。

产物可立即用于PCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。

### ◇后续实验为qPCR

#### 1. 基因组DNA去除

| 组 分                           | 体 积  |
|-------------------------------|--|
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | to 10 $\mu$ l <input type="checkbox"/>         |
| 5 $\times$ gDNA wiper Mix     | 2 $\mu$ l <span style="color: green;">■</span> |
| Total RNA                     | 10 pg - 1 $\mu$ g                              |
| or Poly A <sup>+</sup> RNA    | 10 pg - 100 ng                                 |

用移液器轻轻吹打混匀。42 $^{\circ}$ C 2 min。

#### 2. 配制第一链cDNA合成反应液

| 组 分                                | 体 积   |
|------------------------------------|---|
| 上一步的混合液                            | 10 $\mu$ l                                      |
| 4 $\times$ HiScript IV RT SuperMix | 5 $\mu$ l <span style="color: red;">■</span>    |
| Oligo (dT) <sub>20</sub> VN        | 1 $\mu$ l <span style="color: purple;">■</span> |
| Random Primers                     | 2 $\mu$ l <span style="color: purple;">■</span> |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O      | 2 $\mu$ l <input type="checkbox"/>              |

用移液器轻轻吹打混匀。

▲ 亦可使用GSP (2 pmol)进行逆转录。

#### 3. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

|                  |        |
|------------------|--------|
| 37 $^{\circ}$ C* | 15 min |
| 85 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，有助于提高产量。

产物可立即用于qPCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。

### ◇No RT Control反应(可选)

No RT Control是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应，用于检验RNA模板中是否有基因组DNA残留及基因组DNA去除情况。

| 组 分                           | 体 积   |
|-------------------------------|---|
| 基因组DNA去除后的反应液*                | 10 $\mu$ l                                      |
| 4 $\times$ No RT Control Mix  | 5 $\mu$ l <span style="color: yellow;">■</span> |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 5 $\mu$ l <input type="checkbox"/>              |

用移液器轻轻吹打混匀。

\*若后续实验为PCR，该反应液特指PCR实验流程中第2步结束后的产物；若后续实验为qPCR，该反应液特指qPCR实验流程中第1步结束后的产物。

按下列条件进行No RT Control反应

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 37 $^{\circ}$ C/50 $^{\circ}$ C* | 15 min |
| 85 $^{\circ}$ C                  | 5 sec  |

\*根据应用场景选择适当的反应温度，若后续实验为PCR，推荐使用50 $^{\circ}$ C；若后续实验为qPCR，推荐使用37 $^{\circ}$ C。

产物可立即用于下游PCR/qPCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存。