

HiScript® II Reverse Transcriptase (Glycerol-free)

RL201

Version 22.1



产品概述

HiScript II Reverse Transcriptase (Glycerol-free)是HiScript II Reverse Transcriptase (Vazyme #R201)的可冻干版本。HiScript II Reverse Transcriptase (Glycerol-free)完全去除甘油，将冻干的可行性与甘油版逆转录酶良好的性能、稳定性结合在一起。本产品不包含任何赋形成分，客户可根据需求自定义添加。

产品组分

组分	RL201-01 (10,000 U)	RL201-02 (40,000 U)
■ 5 × HiScript II Buffer	200 µl	800 µl
■ HiScript II Reverse Transcriptase(Glycerol-free) (200 U/µl)	50 µl	200 µl

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C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。

来源

重组*E.coli*菌株，携带有从M-MLV中克隆的改良后的反转录酶基因。

单位定义

以Poly(rA)-Oligo (dT)为模板/引物，在37°C，10 min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)。

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

1.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。

2.后续实验为qPCR

- 将Oligo dT与Random hexamers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。

实验流程

后续实验为PCR

1. RNA模板变性*

RNase-free ddH ₂ O	to 13 µl
Oligo(dT) ₂₃ VN (50 µM) or Random hexamers (50 ng/µl) or Gene Specific Primers (2 µM)	1 µl
Total RNA or Poly A ⁺ RNA	10 pg - 5 µg 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。

2. 配制第一链cDNA反应合成液

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 (Glycerol-free) (200 U/µl)	1 µl ■
RNase inhibitor (40 U/µl)	1 µl

用移液器轻轻吹打混匀。

3. 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	2 min

a. 仅当使用Random hexamers时需要此步骤; 使用Oligo (dT)₂₃VN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-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

后续实验为qPCR

1. 配制第一链cDNA反应合成液

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 (10 mM each)	1 µl
HiScript II Reverse Transcriptase (Glycerol-free) (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 or Poly A ⁺ RNA	10 pg - 1 µg 10 pg - 100 ng

用移液器轻轻吹打混匀。

2. 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	2 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。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。