



产品描述

HiPro™ 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。HiPro™ 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, HiPro™ 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。

产品应用

用于第一链 cDNA 合成。可用于低拷贝基因的检测。合成 cDNA 片段长度最高可达 12 kb。

产品组成

组份	PC211-01 2000U	PC211-02 10000U
HiPro™ Reverse Transcriptase (200U/μl)	10 μl	50 μl
5 × HiPro Buffer	100 μl	500 μl

产品储存

-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)	1 μl
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 × HiPro Buffer	4 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
HiPro™ Reverse Transcriptase (200U/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 × HiPro Buffer	4 μl
dNTP Mix (10mM each)	1 μl
HiPro™ Reverse Transcriptase (200U/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

*可在 30-60 min 间调整。延长逆转录时间可能有助于获得更长的 cDNA (>5 kb)。

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。