



# HiFi-MMLV cDNA Kit

## HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒

Cat. No. CW0744

保存条件：-20℃

### 产品内容

Component	CW0744S (25 rxns)	CW0744M (100 rxns)
HiFi-MMLV, 200 U/μL	25 μL	100 μL
5×RT Buffer	120 μL	500 μL
Primer Mix	60 μL	240 μL
dNTP Mix, 2.5 mM Each	120 μL	500 μL
DTT, 0.1 M	60 μL	240 μL
RNase-Free Water	1 mL	1 mL

## 产品简介

本产品是专为两步法RT-PCR第一步实验配制的cDNA第一链合成试剂盒。本产品包含从RNA模板逆转录成cDNA第一链所需的所有试剂，其中包括HiFi-MMLV逆转录酶、反应缓冲液、引物、dNTP等。经过突变改造的HiFi-MMLV逆转录酶RNase H活性缺失，减少了逆转录反应中RNA的降解，更容易获得全长的cDNA。HiFi-MMLV逆转录酶热稳定性强，可得高产量的cDNA，使用简单方便。本系统对后续的PCR以及定量PCR试验兼容性好，适用各种PCR反应的DNA聚合酶。

## 产品特点

- RNase H-：经突变的HiFi-MMLV逆转录酶，RNase H活性缺失，更易获得全长cDNA。
- 使用方便：试剂盒包含除RNA模板外的逆转录所需全部试剂。

## 注意事项

1. 在操作过程中应避免RNase污染，防止RNA降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行RNA操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37°C处理12小时，并在120°C下高压灭菌30分钟后使用，或者将玻璃器皿在180°C下干热灭菌60分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用0.1%的DEPC处理后进行高压灭菌。
3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20°C，避免反复冻融。
4. 若起始RNA的量小于50ng，建议加入RNA酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0596。

## 使用方法

注意：10 ng-5 μg总RNA可建立20 μL反应体系，如果总RNA量大于5 μg，请按比例扩大反应体系。

### i 逆转录操作步骤：

1. 将RNA模板、引物、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFi-MMLV和RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为20 μL。

试剂	20 $\mu$ L反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 $\mu$ L	500 $\mu$ M Each
Primer Mix	2 $\mu$ L	
RNA Template	X $\mu$ L	1ng-5 $\mu$ g
5 $\times$ RT Buffer	4 $\mu$ L	1 $\times$
DTT, 0.1 M	2 $\mu$ L	10 mM
HiFi-MMLV, 200 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	
RNase-Free Water	up to 20 $\mu$ L	

注意: 1) 若起始RNA的量小于50ng, 则建议加入RNA酶抑制剂 (RNasin)。本试剂盒并未提供, 如需要可单独向本公司订购, 货号: CW0596。

2) Primer Mix由Oligo(dT)和Random Primer配制而成。

- 涡旋震荡混匀, 短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。
- 42 $^{\circ}$ C孵育30-50分钟, 85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。反应结束后, 短暂离心, 置于冰上冷却。
- 逆转录产物可直接用于PCR反应和荧光定量PCR反应, 或置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。

ii 若逆转录效率低, 或RNA模板二级结构复杂、GC含量高时, 建议采用以下步骤:

- 将RNA模板、引物、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFi-MMLV和RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
- 根据以下表格配制反应体系, 总体积为13  $\mu$ L。

试剂	20 $\mu$ L反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 $\mu$ L	500 $\mu$ M Each
Primer Mix	2 $\mu$ L	
RNA Template	X $\mu$ L	1 ng-5 $\mu$ g
RNase-Free Water	up to 13 $\mu$ L	

- 70 $^{\circ}$ C孵育10分钟, 迅速冰浴2分钟。
- 短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。

5. 继续向以上反应液中加入以下试剂：

试剂	20 $\mu$ L 反应体系	终浓度
5 $\times$ RT Buffer	4 $\mu$ L	1 $\times$
DTT, 0.1 M	2 $\mu$ L	10 mM
HiFi-MMLV (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	

注意：1) 若起始RNA的量小于50ng，则建议加入RNA酶抑制剂 (RNasin)。本试剂盒并未提供，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0596。

2) Primer Mix由Oligo (dT) 和Random primer配制而成。

6. 轻轻吹打混匀，42 $^{\circ}$ C孵育50分钟，85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

7. 反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。

8. 逆转录产物可直接用于PCR反应和荧光定量PCR反应，或置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。