

NovoScript® Reverse Transcriptase

目录号: E123

产品描述:

本制品是通过基因重组技术克隆表达M-MuLV的缺失突变型RNase H-的反转录酶。一般的野生型M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 具有以下几种活性: 依赖于RNA的DNA聚合酶活性; 依赖于DNA的DNA聚合酶活性; RNase H活性。由于RNaseH能够催化降解 DNA/RNA杂合体中的RNA, 因此在cDNA第一条链的合成反应中可能会降解RNA/DNA杂合体中的模板RNA。本酶的RNase H活性缺失, 延伸能力强, 可用于较长的cDNA合成, 高比例的全长cDNA文库的构建以及Real Time RT-PCR反应等。

产品用途:

- 1) 1st Strand cDNA的合成;
- 2) cDNA Probe的制备;
- 3) RT-PCR反应以及Real Time RT-PCR反应。

操作方法:

I. cDNA 第一链合成反应体系:

试剂融化后, 将试剂盒中各组分混匀并稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物:

模板RNA	总RNA(0.1 ng -5µg)
	poly(A) mRNA(10 pg)
	特异性RNA(0.01 pg)
引物	Oligo (dT) ₁₈ 1 µl
	Random N6 1 µl
	基因特异性引物15-20 pmol
5×NovoScript® RT Buffer	4 µl
RNase Inhibitor(40 U/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
NovoScript® Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Free Water	至20ul

2) 如果RNA模板GC含量高或者含有二级结构, 可先将RNA模板和RNase Free Water混匀后, 65°C 孵育5分钟, 冰上冷却, 再加入其它组分。

3) 轻轻混匀, 离心。42°C孵育15-30分钟。如果RNA模板中不含poly A结构, 25°C先孵育5分钟, 随后42°C孵育15-30分钟。

反应产物可直接用于 PCR, 如果不立即使用, -20°C 保存少于一周, 长时间保存建议-70°C 放置。

注: 有实验结果提示, 本反转录酶可在 15 分钟内完成 1kb 反转录反应。

保存温度: -20°C。

产品反应 Buffer 中含有高浓度的 DTT, 低温下或者冻融可能会导致沉淀析出, 请恢复至室温并轻摇混匀后使用。

产品包装 (A 包装):

产品组成	体积
NovoScript® Reverse Transcriptase (200 U/µl)	50µl
5×NovoScript® RT Buffer	1ml

质量保证:

经多次柱纯化, SDS-PAGE 胶检测仅可见清晰单一目的条带, PCR 方法检测无大肠杆菌 DNA 残留, 无核酸内、外切酶污染, 无 RNA 酶污染。

活性定义:

以Poly(rA)•Oligo (dT) 为模板/引物, 在37°C、10分钟条件下, 掺入1 nmol的[³H] dTTP所需要的酶量定义为1个活性单位。

II. 第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

常用反应体系 (50µl):

2×Taq Master Mix*	25µl
上游引物	0.2-1.0µM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0µM (终浓度)
模板	1-2µl
ddH ₂ O	至 50µl
	*Mg ²⁺ 终浓度为 2mM

常用 PCR 循环:

94°C,	1 分钟 30 秒
30 次循环:	94°C, 20 秒
	57°C, 20 秒
	72°C, 1kb/60 秒
72°C	5 分钟
4°C	保温

注意事项:

1) 用DEPC处理实验用到的所有实验器材, 或者购买已经证明无核酸酶的实验用具, 实验过程戴手套并经常更换手套, 避免RNA酶的污染。

2) 确保所用试剂及超纯水中无RNA酶污染。

3) 纯化过的RNA必须保证不含有盐, 金属离子, 乙醇和苯酚, 以上成分会干扰第一链cDNA的合成反应。可采用乙醇沉淀RNA的方法去除掉痕量污染物。

4) 为保证反转录反应的有效进行, 需使用高质量的RNA模板。