

NovoScript® II Reverse Transcriptase

目录号: E126

01/ 产品描述

NovoScript® II Reverse Transcriptase 是对 M-MuLV (RNase H-) 进行基因工程改造, 表达并纯化的高温逆转录酶, 比 M-MuLV (RNase H-) 提高了热稳定性。该酶可以在高温条件下 (50~60°C) 进行 cDNA 第一链的合成, 高温条件下有利于打开复杂 RNA 模板链。该酶最佳反应温度为 50°C, 具有热稳定相强、灵敏度高、特异性高、聚合能力强等优点。

02/ 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。

03/ 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。

04/ 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, 请恢复至室温并混匀后使用。

05/ 产品包装

产品组成	E126-01A	E126-01B	E126-M010
NovoScript® II Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50μl	50μl×5	10ml
5×NovoScript® II RT Buffer	1ml	1ml×5	200ml

06/ 活性定义

以 Poly(rA)•Oligo(dT) 为模板/引物, 在 50°C、10 分钟条件下, 掺入 1nmol 的 [³H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位。

07/ 使用建议

- 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) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中, 所有管子确保扣严。
- 4) 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。
- 5) 为保证反转录反应的有效进行, 需使用高质量的 RNA 模板。
- 6) 最快可达 2kb/min, 需要提高反转录效率或模板含量较低时可以适当延长反转录时间。

08/ 操作说明

1. 第一链cDNA合成

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	0.1ng -5μg
	poly(A) mRNA	10pg
	特异性RNA	0.01pg
引物	Oligo (dT) ₁₈	1μl
	Random N6	1μl
	基因特异性引物	15-20pmol
5×NovoScript® RT Buffer		4μl
RNase Inhibitor (40U/μl)		1μl (40U)
dNTPs (10 mM each)		2μl
NovoScript® II Reverse Transcriptase		1μl (200U)
RNase Free Water		至20μl

2) 【可选优化步骤】如果RNA模板GC含量高或含有二级结构，可先将模板与引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65°C孵育5min，冰上冷却。

3) 轻轻混匀，离心。

4) 逆转录反应：

- 如使用Oligo(dT)₁₈或者基因特异型引物，50°C孵育15-30min；
- 如使用随机六聚体引物，25°C先孵育5min，随后50°C孵育15-30min；
- 对于高GC含量或者具有复杂二级结构的RNA模板，使用60°C孵育15-30min。

5) 70°C加热5min终止反应。

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

2. 第一链cDNA的PCR扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

1) 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	1-50ng（质粒）
	10ng-1μg（基因组）
ddH ₂ O	至50μl

*Mg²⁺终浓度为2mM

2) 常用 PCR 循环：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	90s	1
变性	94°C	20s	30
退火	57°C	20s	
延伸	72°C	1kb/60s	
终延伸	72°C	5min	1
保温	4°C		

09/ 相关产品

目录号	产品名称	目录号	产品名称
E226	NovoScript® III Reverse Transcriptase	E226-03	NovoScript® III Reverse Transcriptase (Glycerol-Free)
Z087	Taq antibody	Z087-03	Taq antibody (Glycerol-Free)
E001	Taq DNA Polymerase	E001-03	Taq DNA Polymerase (Glycerol-Free)
E097	HotStart Taq DNA Polymerase (B)	E097-03	HotStart Taq DNA Polymerase (B) (Glycerol-Free)
E017	HotStart Taq DNA Polymerase	E017-03	HotStart Taq DNA Polymerase (Glycerol-Free)
E063	Heat-labile Uracil-DNA Glycosylase	E063-03	Heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (Glycerol-Free)
E060	Uracil-DNA Glycosylase (UDG)		