

NovoScript® III Reverse Transcriptase

目录号: E226

01/ 产品描述

NovoScript® III 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 50-55°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/ 保存温度

-20°C。

04/ 产品包装

产品组成	E226-01A	E226-01B	E226-02-U500	E226-02-M020
NovoScript® III Reverse Transcriptase (200U/μl)	50μl	250μl	500μl	20ml
5×NovoScript® III RT Buffer	1ml	2.5ml×2	-	-

05/ 活性定义

以 Poly(rA)•Oligo(dT)为模板/引物, 在 50°C、10min 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。

06/ 质量控制

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。

07/ 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. 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。

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，轻轻混匀，离心：

模板RNA	总RNA	0.1ng-5 μ g
	poly(A) mRNA	10pg
	特异性RNA	0.01pg
引物	Oligo (dT) ₁₈ (50 μ M)	1 μ l
	Random N6 (100 μ M)	1 μ l
	基因特异性引物	15-20pmol
5 \times NovoScript [®] III RT Buffer		4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)		1 μ l
dNTPs (10 mM)		1 μ l
NovoScript [®] III Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)		1 μ l
RNase Free Water		至20 μ l

【注】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 $^{\circ}$ C 孵育 5min，冰上冷却。

2) 如果使用 Oligo(dT)₁₈ 或者基因特异性引物，50 $^{\circ}$ C 孵育 15-30min。使用随机六聚体引物时，25 $^{\circ}$ C 先孵育 5min，随后 50 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 孵育 15-30min。

3) 终止反应：75 $^{\circ}$ C 加热 5min。

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

常用反应体系（50 μ l）：

2 \times Taq Master Mix*	25 μ l
上游引物	0.2-1.0 μ M（终浓度）
下游引物	0.2-1.0 μ M（终浓度）
模板	1-50ng（质粒）
	10ng-1 μ g（基因组）
ddH ₂ O	至 50 μ l

*Mg²⁺终浓度为 2mM

常用 PCR 循环：

反应阶段	循环数	温度	时间
预变性	1	94 $^{\circ}$ C	1min30s
变性	30	94 $^{\circ}$ C	20s
退火		57 $^{\circ}$ C	20s
延伸		72 $^{\circ}$ C	1kb/60s
终延伸	1	72 $^{\circ}$ C	5min
保温	1	4 $^{\circ}$ C	