

高敏反转录酶

产品组成

Cat. No.	8106050	8106200
高敏反转录酶	50 μ l	200 μ l
5 \times RT Buffer	0.5 ml	1 ml
RNase-free Water	1.5 ml	1.5 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20 $^{\circ}$ C 保存有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

高敏反转录酶是通过基因修饰和重组技术获得的第三代 M-MLV 反转录酶。该酶相对于野生型 M-MLV 逆转录酶去除了 RNase H 活性，并大幅提高了反转录速度和热稳定性（最高耐受温度为 60 $^{\circ}$ C），增强了对 RNA 复杂二级结构的耐受性。高敏反转录酶抗干扰性强，对低拷贝的 RNA 模板反转录效率非常高，是 RT-PCR 核酸检测试剂盒首选的反转录酶。

产品应用

1. cDNA 文库构建。
2. RT-PCR 反应及 Real Time RT-PCR 反应。
3. 引物延伸。
4. RNA 测序。
5. 一步法 RT-PCR

活性单位

产品浓度为 200 U/ μ l。活性单位定义：以 Poly (rA)为模板，Oligo (dT)为引物，在 37 $^{\circ}$ C 条件下，10 分钟内催化 1 nmol dTTP 掺入所需酶量定义为 1 个活性单位(U)。

纯度

以考马斯蓝染色 SDS-PAGE 检测纯度大于 90%，本品无核酸内切酶、外切酶及 RNase 污染。

用户需自备的试剂与物品

1. oligo(dT)₁₂₋₁₈ (25 μ M) 或随机引物 (25 μ M) 或基因特异性引物 (1 μ M)
2. dNTPs (10 mM each, Simgen Cat. No. 7701100)
3. 可能需要 RNase Inhibitor (Simgen Cat. No. 8008125)
4. RNase-free 的 1.5 ml 离心管
5. 移液器及吸头 (为避免 RNA 酶的污染，必须选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头)
6. 一次性手套、口罩等防护用品
7. 恒温水浴锅
8. 在无 RNA 酶使用的实验室操作：因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中穿戴乳胶手套和口罩。

操作步骤

1. 在无 RNase 的已灭菌微型离心管中加入以下试剂：

- 1) 2 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ (25 μ M) 或 2 μ l 随机引物 (25 μ M) 或 2 μ l 基因特异性引物 (1 μ M)；
- 2) 0.5-5 μ g Total RNA 或 50-500 ng mRNA；

* 少于 0.5 μ g Total RNA (比如病毒 RNA 的反转录) 使用量时应将高敏反转录酶用量减少至 0.05-0.5 μ l, 否则可能会导致后续 PCR 扩增产生非特异性扩增产物。

* 少于 0.5 μ g Total RNA 使用量时建议再加入 1 μ l RNase Inhibitor (Simgen Cat. No. 8008125)。

* 如果 RNA 模板需要在 70 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟以破坏二级结构的, 也不应省略 RNase Inhibitor 的加入。

- 3) 1 μ l dNTPs (10 mM each) ;

- 4) 补加 RNase-free Water 至 15 μ l。

* 如果 RNA 模板 GC 含量丰富或者有复杂的二级结构, 增加以下步骤: 在 70 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟以破坏 RNA 二级结构, 再迅速置于冰上以阻止二级结构重新形成, 然后短暂离心至管底。

2. 按下表加入试剂：

步骤 1 混合液	15 μ l
5 \times RT Buffer	4 μ l
高敏反转录酶	1 μ l *
Total	20 μl

*少于 0.5 μ g Total RNA 使用量时应将高敏反转录酶用量减少至 0.05-0.5 μ l。

3. 轻柔混匀, 用随机引物作为引物时 25 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟。
4. 50 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。
5. 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后冰上冷却或储存于 - 20 $^{\circ}$ C 备用。
6. 用 RNase-free Water 稀释到 50 μ l, 取 2-5 μ l 用于 PCR 扩增。