

ThermoScript H⁻ MMLV Reverse Transcriptase



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC4301	5000U
PC4302	10000U

组成	PC4301	PC4302
ThermoScript H ⁻ RTase (200U/μl)	5000U	10000U
5×RT Buffer	250μl	500μl

产品组成、储存、浓度：

储存：-20℃ 保存。浓度：200 units/μl

制品说明： 本制品使用通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 ThermoScript H⁻ RTase。同时经过多点突变，提高了反转录温度耐受性，可以在高达 55-60℃ 进行反转录（更高温度反转时活性会部分减低）。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H 活性能够催化降解 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 M-MuLV(RNase H⁻)的 RNase H 活性缺失，与 M-MuLV 相比，具有更强的延伸能力和稳定性，可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高，二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

适用范围： 第一链cDNA合成。可用于低拷贝基因的检测。

特点： 合成cDNA片段长度最高可达12 kb。

第一链cDNA合成(以20 μl反应体系为例)

1. 加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5 μg/5-500 ng
Oligo(dT) ₁₈ (0.5 μg/μl) or	1 μl
Random Primer(0.1 μg/μl) or	1 μl
GSP(Gene Specific Primer)	2 pmol
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
5× RT Buffer	4 μl
RNase Inhibitor(40 units/μl)	0.5 μl
ThermoScript H ⁻ RTase	0.8-1μl (见注意事项 4)
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl

2. 轻轻混匀

如用Oligo(dT)₁₈或基因特异引物(GSP), 50°C-55°C孵育30-50min。

如用Random Primer, 23°C孵育10 min, 50°C-55°C孵育30-50 min。

3. 85°C加热5 min失活THERMOscript H⁻ RTase。

注意: GC含量高(>50%)或者二级结构复杂模板, 可以提高反转录温度至60°C左右。

RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板。

建议PCR条件(以50 μl反应体系为例)

Components	Volume	Final Concentration
cDNA Template	2 μl	as required
Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
10×Taq Buffer (含Mg ²⁺)	5 μl	1×
2.5 mM dNTPs	4 μl	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.5 μl	2.5 units
ddH ₂ O to final volume	50 μl	Not applicable

PCR 循环

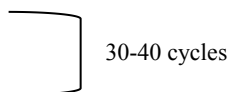
94°C 2-5 min

94°C 30 sec

50-60°C 30 sec

72°C 1-2 kb/min

72°C 5-10 min



注意事项:

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. 如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构, 可以先只加RNA模板、引物和和RNase free H₂O混匀, 65°C变性5分钟, 冰上冷却, 短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
4. THERMOscript H⁻ RTase/RNase Inhibitor Mix非常粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照0.8μl使用, 也不影响使用效果。