

# TRUEscript H Minus M-MLV Reverse Transcriptase

目录号: PR127

产品内容:

组成	PR127-01 (5000U)	PR127-02 (10000U)	PR127-03 (10000U×5)
TRUEscript H <sup>-</sup> RTase (200U/ μl)	5000U	10000U	10000U×5
5×RT Buffer	250μl	500μl	3×500μl

**产品储存:** -20 °C 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 TRUEscript H<sup>-</sup> RTase。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<sup>-</sup>)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。

**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) <sub>18</sub> (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

TRUEScript H <sup>-</sup> RTase	0.8-1µl (见注意事项 4)
RNase free H <sub>2</sub> O to final volume	20 µl

2. 轻轻混匀

如用Oligo(dT)<sub>18</sub>或基因特异引物(GSP), 42℃ 孵育30-50min。

如用Random Primer, 25℃ 孵育10 min, 42℃ 孵育30-50 min。

3. 65℃ 加热15 min(或者85℃ 加热5 min)失活TRUEScript H<sup>-</sup> RTase。

**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 <sup>2+</sup> )	5 µl	1×
2.5 mM dNTPs	4 µl	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	2.5 units
ddH <sub>2</sub> O to final volume	50 µl	Not applicable

**PCR 循环**

94℃ 2-5 min

94℃ 30 sec

50-60℃ 30 sec

72℃ 1-2 kb/min

72℃ 5-10 min

30-40 cycles

**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RNase free H<sub>2</sub>O混匀, 65℃ 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. TRUEScript H<sup>-</sup> RTase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。**

密码子生物科技有限公司  
<http://www.codonx.com/>