

Imagene®

THERMOscript H M-MLV Reverse Transcriptase

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CODONX

RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

THERMOscript H Minus M-MLV Reverse Transcriptase

包装量:

目录编号	包装单位
PR128-01	5000U
PR128-02	10000U

产品组成、储存、浓度:

组成	PR128-01	PR128-02
THERMOscript H ⁻ RTase (200U/ μl)	5000U	10000U
5×RT Buffer	250μl	500μl

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 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 45-55°C 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℃孵育50min。

如用Oligo(dT)₁₈在55℃反转录, 首先应该42℃孵育5 min, 然后55℃孵育50min。

如用Random Primer, 25℃孵育10 min, 50℃孵育50 min。

 3. 65℃加热15 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55℃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

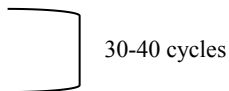
94°C 2-5 min

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。**

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

