

嗜温逆转录酶使用说明书

(产品货号: EM104)

描述: 嗜温逆转录酶 (Reverse Transcriptase) 是来自莫洛尼小鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus) 经改造去除 RNaseH 活性的 RNA 导向的 DNA 聚合酶, 热稳定性高, 耐受温度可达 55°C, 并具有极强的延伸能力, 可以高产量制备全长的第一链 cDNA, 产物 cDNA 可从 100 bp-15 kb。

产品组分与规格

货号	组分	20,000 U
EM104	嗜温逆转录酶 (200 U/μl)	100 μl
	5×RT Buffer 3.0	1 mL
	DTT (100 mM)	500 μl

储存液及反应液

储存液: 20 mM Tris-HCl pH 7.5 @ 25°C, 100 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 0.01% Tween 20, 50 %甘油。

反应液 (5×RT Buffer 3.0): 250 mM Tris-HCl pH 8.3 @ 25°C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50mM DTT。

酶活定义

一个酶活单位 (U) 定义为: 在 37 °C, 10 分钟内催化将 1nmol 脱氧核苷酸转移到酸沉淀物质中所需的酶量定义为一个活性单位。

应用

RT-PCR; 第一链 cDNA 合成; 制备 cDNA 探针; 合成具有高比例全长 cDNAs 的 cDNA 文库

储存

-20±5°C, 可保存 1 年。

使用方法

1. cDNA 第一链合成:

1.1 按以下组分配制反应体系

组分	每管加样量
5x RT Buffer 3.0	4
嗜温逆转录酶(200U/μl)	1
dNTP (10 mM each)	1
Total RNA or Poly(A) RNA	0.1-2
Oligo dT(20)或随机引物或基因特异性引物	1
DTT (100mM)	2
RNase抑制剂 (40U/μl)	0.5-2*
RNase Free H ₂ O	Up to 20

注:

1. Oligo dT(20)使用浓度为 50μM, 如使用随机引物可使用 50-250ng, 基因特异性引物可使用 5μM。
2. * 来源于胰腺组织的 RNA, 建议加入 2μl RNase inhibitor。

1.2 按下列条件在 PCR 仪上进行反应条件设置

温度	时间
25°C	5 分钟
50°C	30~60 分钟
85°C	10 分钟
4°C	

1.3 反转录所得 cDNA 可直接用于核酸扩增（检测）反应或下游实验。

2. PCR反应:

2.1 按以下组分配制反应体系

组分	每管加	注:
10×PCR Buffer		1. *MgCl ₂ 的最佳浓度可自行调节。
MgCl ₂ * (50 mM)		2. 10 × PCR Buffer : 200 mM
dNTP (10 mM each)		Tris-HCl(pH 8.4), 500 mM KCl
F-引物 (10μM)	1	
R-引物 (10μM)	1	
Taq DNA聚合酶 (5 U/μl)	0.4	
cDNA (来自第一链反应)	2	
RNase Free H ₂ O	Up to 50	

2.2 轻轻混匀并在表面加入 1-2 滴（约 50μl）石蜡油（注：在有加热盖的热循环装置中，不需要添加石蜡油。）

2.3 94°C加热 2 分左右激活 Taq DNA 聚合酶活性（具体时间依据不同的修饰方法而定）。

2.4 进行 15-45 个 PCR 循环，退火温度以引物序列不同进行调整。

