

High-Accuracy Reverse Transcriptase

REF: EG21104S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
High-Accuracy Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50 μl
5× M-MLV First Strand Buffer	500 μl
0.1 M DTT	100 μl

产品简介

High-Accuracy Reverse Transcriptase 是通过基因修饰和重组技术克隆表达的 RNase H 活性缺失型莫洛尼氏鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV) 逆转录酶, 它利用核酸适配体技术, 通过共价键作用结合到 M-MLV 上, 能抑制 M-MLV 在 31°C 以下的活性, 从而提高产物特异性。经过基因工程改造, 本酶的最适反应温度提升至 50°C, 延伸能力更强, 可用于较长的 cDNA 合成。

活性定义

37°C条件下, 以 Poly(A)-Oligo(dT) 为模板 / 引物, 在 10 min 内, 掺入 1 nmol 的 [³H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

宿主原性DNA检测

无宿主 DNA 污染。

核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h, 通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法

第一链 cDNA 合成步骤

1. 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
引物	x μl
Oligo(dT) ₂₀	终浓度 2.5 μM
或随机引物	终浓度 2.5 ng/μl
或基因特异性引物	终浓度 0.25 μM
模板 RNA ^a	50 ng~1 μg/20 μl
dNTP Mix (10 mM Each)	1 μl
Nuclease-Free Water	To 13 μl

a. 推荐使用试剂盒提取的已去除基因组 DNA 污染的高质量 RNA 作为模板。

2. 将以上混合液在 65°C 温育 5 min, 迅速取出置于冰上冷却 1 min;

3. 向反应混合液中继续加入:

试剂	使用量
5× M-MLV First Strand Buffer	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
High-Accuracy Reverse Transcriptase	1 μl
(可选) RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl

4. 轻柔吸打混匀后, 瞬离;

5. 若使用 Oligo(dT)₂₀ 或基因特异性引物, 50°C 温育 30 min; 若使用随机引物, 先 25°C 温育 5 min, 之后 50°C 温育 30 min;

6. 反应结束后, 85°C 温育 5 min 以终止反应;

7. 将获得的 cDNA 溶液置于冰上, 用于后续实验。

注: cDNA 溶液置于 -20°C 可保存半年; 置于 -80°C 可长期储存。