Neoscript RTase

货号：E13

2024V02

产品概述

Neoscript RTase 是由 Moloney 鼠白血病病毒来源的 M-MLV 基因经突变筛选，并通过大肠杆菌表达获得的反转录酶，该酶去除了 RNase H 活性，具有更高的温度耐受性，适用于高温反转录，有利于消除 RNA 高级结构与非特异性因素对 cDNA 合成的不利影响，具有更高的稳定性和反转录合成能力。

规格

200 U/μL

试剂组成

1．200 U/μL Neoscript RTase

2．5×First-Strand Buffer（选配）

*5×First-Strand Buffer 不含 dNTP，配制反应体系时请加入 dNTPs 使用。

活性定义

以 poly(A)•Oligo(dT)$_{25}$ 为模板/引物，在 37°C条件下，10 min 内掺入 1 nmol 的 dTTP 所需的酶量为 1 个活性单位（U）。

储存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH7.5)，100 mM NaCl，0.1 mM EDTA，1 mM DTT，Stabilizer，50% Glycerol。

保存条件

-20°C长期保存，使用前应混匀，避免反复冻融。

质量控制

1. SDS-PAGE 电泳纯度大于 98%。
2. 扩增灵敏度、批间差异、稳定性。
3. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

第一链的合成

1. 参考下表进行体系配制；

Component	Concentration in Master Mix
Oligo(dT)$_{12-18}$ Primer	50 pmol
Or Random Primer *	50 pmol（20~100 pmol）
Or Gene specific Primer *	2 pmol
dNTPs（10 mM each）	1 μL
Template RNA	total RNA ⩽ 5 μg；mRNA ⩽ 1 μg；
RNase-free dH$_2$O	To 10 μL

*根据实验需要选择不同类型的引物。

2. 65°C加热 5 min，冰上迅速降温 2 min；
3. 在上述体系中再加入以下组分，至总体积为 20 μL，轻轻混匀。

Component	Concentration in Master Mix
5×First-Strand Buffer	4 μL
200 U/μL Neoscript RTase	1 μL
40 U/μL RNase Inhibitor	1 μL
RNase-free dH_2O	To 20 μL

4. 按如下条件进行反应。

（1）如使用 Random Primer 随机引物，应先于 25°C温浴 10 min；然后 50°C温浴 30~60 min；

（2）如使用 Oligo dT 或特异性引物，则于 50°C温浴 30~60 min。

5. 95°C加热 5 min 灭活 Neoscript RTase，终止反应。

6. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，或置于-20°C长期保存。

PCR 反应

1. 参考下表进行体系配制：

Component	Concentration in Master Mix
10×PCR Buffer (Mg^{2+} free)	1×
dNTPs（10 mM each）	200 μM
25 mM $MgCl_2$	1~4 mM
5 U/μL Taq DNA Polymersase	2~2.5 U
Primer 1（10 μM）	0.2~1 μM
Primer 2（10 μM）	0.2~1 μM
Template *	⩽ 10%第一链反应液（2 μL）
ddH_2O	To 50 μL

*如若第一链反应液加入量过多，可能会抑制 PCR 反应。

2. PCR 反应程序：

步骤	温度	时长	循环数
变性	95°C	2~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	30~40
退火	50~60°C	10~30 s	
延伸	72°C	10~60 s	

技术说明

1. 适用于 42°C~55°C范围内进行反转录温度优化。
2. 具有更好的稳定性，适用于高温反转录扩增，有利于有效通过 RNA 复杂结构区域，适用于一步法多重荧光定量 RT-PCR 检测。
3. 与各种 PCR 扩增酶具有良好的兼容性，适用于高灵敏度 RT-PCR 反应。
4. 适用于高灵敏度一步法荧光定量 RT-PCR 反应，有效提高低浓度模板的检出率。
5. 适用于 cDNA 文库构建。
6. 3’ 和 5’ RACE。