

MetaScript Reverse Transcriptase

货号: **J01002-10000** 规格: **10000 Units**

J01002-50000 **50000 Units**

浓度: **200 U/μl**

保存: **-20℃**

描述:

MetaScript Reverse Transcriptase是在M-MLV反转录酶基础上进行改造,从表达Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase的*E.coli*细胞中分离纯化而得。MetaScript Reverse Transcriptase是通过对M-MLV reverse transcriptase基因进行密码子优化,并对多个位点进行突变,诱导表达的可溶性高活性蛋白,经SDS-PAGE凝胶电泳检测纯度>95%。MetaScript Reverse Transcriptase具有RNaseH活性低、保真性高,热稳定性好、特异性强的特点。与野生型M-MLV反转录酶相比,MetaScript Reverse Transcriptase可在更高的温度下用于第一链cDNA的合成,提高了反转录的特异性及cDNA的产量,能够获得更长的cDNA产物。产生cDNA的长度从100bp至>9kb。

热稳定性 —— 50℃放置8小时活性无明显下降

产 量 —— 降低了RNaseH活性,可用于更多全长cDNA的合成

特 异 性 —— 50℃时完全的活性,增加了基因特异性引物的特异性

应 用 —— Array labeling, cDNA libraries, RT-PCR, primer extension, 3' and 5' RACE

组分:

MetaScript Reverse Transcriptase	250 μl
5×First-Strand Buffer	1000 μl *2
0.1M DTT	1000 μl

活性定义:

以Oligo(dT)₂₀为引物,在37℃下,将10 min内摄入1 nmol的dTTP成为酸不溶性沉淀物时所需要的酶量定义为1 U。

质量控制:

本产品已经通过了如下的质量控制:

使用SDS聚丙烯酰胺分析纯度,不存在核酸内切酶,核酸外切酶,以及核糖核酸酶的活性;cDNA产物和长度。

反应液(5×First-Strand Buffer):

250 mM Tris-HCl(室温下pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂



GenePharma

Suzhou GenePharma Co., Ltd.

199 Dongping Street, Suzhou Industrial Park, China, 215123

Tel: +86 512 86668828 Fax: +86 512 86665900

Email: szservice@genepharma.com www.genepharma.com

贮存液:

20 mM Tris-HCl (PH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol

贮存:

所有的组分保存于 -20°C , 使用之前于室温融解 $5\times$ First-Strand Buffer 和 0.1 M DTT, 使用后及时放于 -20°C 。

第一链合成:

下面的 20 μl 反应体系可用于 10 pg - 5 μg 总 RNA 或者 10 pg - 500 ng mRNA

1. 加入下列组分至 RNase-free 的 EP 管中:

组分	加入量
Oligo(dT) ₂₀ (50 μM)/ Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ / 随机引物/基因特异性引物	1 μl /200 - 500 ng/50 - 250 ng/2 pmol
总 RNA/ mRNA	10 pg - 5 μg /10 pg - 500 ng
25 mM dNTP mix	0.4 μl
加去离子水	至总体积 13 μl

2. 70°C 加热 5min, 立即冰浴至少 1 min;

3. 离心反应体系, 加入下列试剂:

组分	加入量
$5\times$ First-Strand Buffer	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
RNase 抑制剂 (40 U/ μl)	1 μl
MetaScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	1 μl

4. 用移液器吸嘴上下吹打混匀。如果用的是随机引物, 将 EP 管 25°C 孵育 10 min;
5. 50°C 孵育 30 - 60min。用基因特异性引物时, 增加反应温度至 55°C 。对于困难模板或含高级结构的模板, 反应温度可能增加至 55°C ;
6. 85°C 10 min 以终止反应;
7. 获得的 cDNA 可以作为模板用于 PCR 扩增。然而, 一些长片段的 cDNA 需要用大肠杆菌 RNaseH 去除与 cDNA 互补的 RNA。

注: 仅限于科研使用, 请勿用于动物或人类诊断及治疗



B026-V001B-20140825