耐热反转录酶 ThermoStable V Reverse Transcriptase 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

ThermoStable V Reverse Transcriptase 反转录酶是在鼠源病毒反转录酶基础上进行定点突变改良而得。该酶去除了 RNase H 活性中，从而避免反转录过程中降解 RNA。同时经过突变文库筛选，使得其热稳定性更强，可耐受 65°C 高温反应。相比于低温条件下反转录反应，采用高温反转录可显著打开 RNA 二级结构，从而提高复杂 RNA 模板的扩增性能、提高反转录 cDNA 的长度和产量，从而提高后续检测的灵敏度。

组分

名称	10KU	50KU
ThermoStable V RTase (200 U/μl)	50 μl	250 μl
5×RT Buffer	1ml	1mlx10

单位定义: 以 poly(rA) 为模板、oligo(dT) 为引物，在 37° C 条件下，10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 掺入形成酸不溶性沉淀物所需要的酶量，定义为一个活性单位。

储存: -20° C 可保存 3 年。

操作方法

1. 按以下组分配制反应体系

<u>ThermoStable V RTase</u>	<u>0.5-1 μl</u>
<u>5×RT Buffer</u>	<u>4 μl</u>
<u>dNTP Mixture (10 mM each)</u>	<u>1 μl</u>
<u>Total RNA or Poly(A) RNA</u>	<u>0.1-2 μg</u>
<u>20×Oligo dT(25)&Random Primer *</u>	<u>1 μl</u>
<u>RNase Inhibitor (40 U/μl)</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>RNase Free H₂O</u>	<u>Up to 20 μl</u>

*注: Oligo dT(25) 使用浓度为 20~50 μM，如使用 Random9

随机引物可使用 125 μM，基因特异性引物可使用 5 μM。

2. 在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应

30 °C	5 min
*37~65 °C	15~60 min
85 °C	10 min
4 °C	

*通常反转录温度设置为50° C，无论是高GC或长片段模板，均可获得综合性的cDNA产量。
在采用 65° C 反应条件时可显著提高>75%GC 含量的 cDNA 产物。

3. 反转录所得的 cDNA 可直接用于 PCR 反应或储存于-20° C。