

## 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。

## 试剂组成

| 组分                         | BR1D101-01<br>10,000 U | BR1A102-02<br>40,000 U | BR1A102-03<br>200,000 U |
|----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Neoscript RTase (200 U/μL) | 0.05 mL                | 0.2 mL                 | 1 mL                    |

## 活性定义

以 poly(A)·Oligo(dT)<sub>25</sub> 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±5°C 存储。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途, 不用于临床诊断。
2. 使用前充分混匀, 避免反复冻融; 反复冻融会造成产品活性下降。若单次取用体积较少, 建议试剂分装保存。
3. 适用于 42°C-55°C 范围内进行反转录温度优化。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 适用于 cDNA 文库构建。
8. 3' 和 5' RACE。

## 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

| 组分                                | 终浓度                            |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Oligo(dT) <sub>12-18</sub> 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 <sub>2</sub> 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  $\mu$ L, 轻轻混匀。

| 组分                             | 加量            | 终浓度           |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| 5×First-Strand Buffer          | 4 $\mu$ L     | 1×            |
| 200 U/ $\mu$ L Neoscript RTase | 1 $\mu$ L     | 10 U/ $\mu$ L |
| 40 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor  | 1 $\mu$ L     | 2 U/ $\mu$ L  |
| RNase-free dH <sub>2</sub> O   | To 20 $\mu$ L | -             |

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:

| 组分                                    | 加量              | 终浓度                     |
|---------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 10×PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> free) | 5 $\mu$ L       | 1×                      |
| dNTPs (10 mM each)                    | 1 $\mu$ L       | 200 $\mu$ M             |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>               | 2-8 $\mu$ L     | 1-4 mM                  |
| 5 U/ $\mu$ L Taq DNA Polymerase       | 0.4-0.5 $\mu$ L | 0.04-0.05 U/ $\mu$ L    |
| Primer 1 (10 $\mu$ M)                 | 1-5 $\mu$ L     | 0.2-1 $\mu$ M           |
| Primer 2 (10 $\mu$ M)                 | 1-5 $\mu$ L     | 0.2-1 $\mu$ M           |
| Template *                            | -               | ≤ 10%第一链反应液 (2 $\mu$ L) |
| ddH <sub>2</sub> O                    | To 50 $\mu$ L   | -                       |

\*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    | 1-5 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 |       |