

## 产品概述

本试剂盒提供了所有用于 cDNA 第一链合成的试剂。其中 Neoscript RTase 是由 Moloney 鼠白血病病毒来源的 M-MLV 基因经突变筛选、并通过大肠杆菌重组表达获得的逆转录酶，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，其对 cDNA 第一链合成的片段长度可以达 12 kb。

## 试剂组成

1. 200 U/ $\mu$ L Neoscript RTase
2. 5 $\times$  First-Strand Buffer
3. 40 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor
4. Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (50  $\mu$ M)
5. Random 6 mers (50  $\mu$ M)
6. 10mM dNTP Mix

## 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)。

## 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。

试 剂	20 $\mu$ L 体系	终浓度
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	2.5 $\mu$ M
Or Random 6 mers (50 $\mu$ M) *	1 $\mu$ L (0.4~2 $\mu$ L)	2.5 $\mu$ M (1~5 $\mu$ M)
Or Gene specific Primer (10 $\mu$ M) *	0.2~2 $\mu$ L	0.1~1 $\mu$ M
10 mM dNTP	1 $\mu$ L	500 $\mu$ M
Template RNA	—	total RNA $\leq$ 5 $\mu$ g; mRNA $\leq$ 1 $\mu$ g
RNase-free dH <sub>2</sub> O	To 10 $\mu$ L	—

\*2 kb 以下的 cDNA 合成时，Random 6 mers 的使用量为 1~2  $\mu$ L；2 kb 以上的 cDNA 合成时，Random 6 mers 的使用量为 0.4~1  $\mu$ L。也可使用 Gene specific Primer，此时其在反应体系中的终浓度为 0.1~1  $\mu$ M。

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。

试 剂	20 $\mu$ L 体系	终浓度
5 $\times$ First-Strand Buffer	4 $\mu$ L	1 $\times$
200 U/ $\mu$ L Neoscript RTase	1 $\mu$ L	10 U/ $\mu$ L
40 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor	0.5 $\mu$ L	1 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 (或 70°C 加热 15 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。

## 技术说明

1. 高纯度完整的 RNA 模板对于逆转录高质量及完整的 cDNA 链非常关键。RNA 模板制备过程中会带入少量基因组 DNA, 这些 DNA 可能会随着目标基因一起扩增, 如果扩增要求完全无基因组 DNA 污染, 则建议使用 DNase I 进行预处理。

2. RNase Inhibitor 的加入能够有效抑制核酸酶对 RNA 模板的降解作用。

3. 在进行长片段扩增时, 为了防止 cDNA 结构被破坏, 建议逆转录酶的灭活条件设置为 70°C 处理 15 min。

4. 当扩增条带亮度较弱时, 建议适当提高 RNA 模板浓度及引物浓度。

5. Neoscript RTase 具有更好的稳定性, 适用于 42~55°C 范围内进行逆转录。当扩增具有复杂结构区域的 RNA 时, 可通过提高逆转录温度来增加反应的特异性。

6. 适用于 cDNA 文库构建。

7. 3' 和 5' RACE。

8. 扩增前后请使用专用的区域和移液器, 戴手套操作并经常更换; PCR 反应完成后切勿打开反应管, 以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。