

M5 HiperScript III Reverse Transcriptase

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiperScript III Reverse Transcriptase	10000U	MF310-01
M5 HiperScript III Reverse Transcriptase	5×10000U	MF310-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

【产品简介】

M5 HiperScript III Reverse Transcriptase 是基因工程改造后的 M-MLV 反转录酶(莫洛尼氏鼠白血病病毒 pol 基因)，降低了 RNA 酶 H 活性，增强了热稳定性。由于 M5 HiperScript III Reverse Transcriptase 可以在高至 55°C 下合成 cDNA 第一链，从而能得到比其它的反转录酶特异性更好、产量更高的 cDNA，并且更多的全长 cDNA。M5 HiperScript III Reverse Transcriptase 从 100 bp 到 12 Kb 以上的 cDNA。

【单位定义】

1 单位指以 poly(A)为模板、oligo(dT)₂₅ 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。

【产品组分】

	MF310-01	MF310-05
M5 HiperScript III Reverse Transcriptase (200U/μl)	50 μl	5x 50 μl
5x M5 HiperScript III RT Buffer	500 μl	5x500 μl

贮存溶液：20 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C)，100 mM NaCl，0.1 mM EDTA，1 mM Dithiothreitol (DTT)，0.01% Nonidet™ P-40 (NP-40) (V/V)，50%甘油(V/V)。

【适用范围】

合成 cDNA 第一链，用于 RT-PCR 和实时 RT-qPCR，用于克隆和表达研究。

制备带标记的 cDNA 探针，用于 microarray 研究；DNA 标记和引物延伸法分析 RNA。

【质量检测】

核酸外切酶活性：50 μl 反应体系中，500 U 本酶与 1 μg 的 pUC19 质粒于 37°C 温育 4 小时，电泳条带无明显变化。

核酸内切酶活性：50 μl 反应体系中，2000 U 本酶与 1 μg 的 Hind III 消化的 λDNA 于 37°C 温育 4 小时，电泳条带无明显变化。

RNase 活性：25 μl 反应体系中，1000 U 本酶与 250 ng 的大肠杆菌 rRNA 于 37°C 温育 2 小时，经琼脂糖电泳检测，被降解的 rRNA 小于 1%。

纯度：经 SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于 90%。

【使用方法】**A. 第一链 cDNA 的合成:** (以下 20 μ l 的反应体系可以用于反转录 10 pg-5 μ g 总 RNA 或 10 pg-500 ng mRNA)

1. 将以下组分加入无核酸酶的微量离心管中

1 μ l oligo(dT)₂₀(50 μ M)或 200–500 ng oligo(dT)₁₂₋₁₈ 或 50–250 ng 随机引物或 2 pmole 基因特异性引物
 10 pg-5 μ g 总 RNA 或 10 pg-500 ng mRNA
 1 μ l 10 mM dNTP 混合物(dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP 均为 10 mM, pH 中性)
 加入灭菌蒸馏水至 14 μ l。

2. 混合物在 65°C 加热 5 分钟后, 迅速置于冰上冷却至少 1 分钟。

3. 短暂离心收集组分后, 加入:

4 μ l 5x M5 HiperScript III RT Buffer
 1 μ l RNase 抑制剂(40 U/ μ l)*
 1 μ l M5 HiperScript III Reverse Transcriptase (200U/ μ l)**

* RNase 抑制剂不随酶附送, 需要单独采购。如果起始 RNA 的量小于 50 ng, 则必须加入 RNase 抑制剂。

** 对于长 cDNA 片段(>5 kb), 使用 oligo(dT)₂₀ 或基因特异性引物在 50°C 之上反应时, 增加 M5 HiperScript III Reverse Transcriptase (200U/ μ l)的用量至 400U (2 μ l)可以增加 cDNA 的产量。

4. 用枪头反复吸打混匀组分, 如果使用的是随机引物, 应在 25°C 下孵育 5 分钟。

5. 50°C 孵育 30-60 分钟, 如果使用基因特异性引物、复杂模板或富含二级结构的模板需将反应温度增加到 55°C。

6. 在 70°C 加热 15 分钟以终止反应。

注意: cDNA 产物可以直接作为 PCR 的模板。如果扩增的 PCR 产物大于 1 kb, 则需要去除与 cDNA 互补的 RNA。可以使用 1 μ l(2 U) 的 *E.coli* RNA 酶 H 在 37°C 孵育 20 分钟以去除与 cDNA 互补的 RNA。

B. PCR 反应体系和程序:

1. 在 PCR 反应管中加入下列成分:

10x Taq PCR 缓冲液	5 μ l
50mM MgCl ₂	1.5 μ l
10mM dNTP 混合物	1.0 μ l
上游扩增引物 (10 μ M)	1.0 μ l
下游扩增引物 (10 μ M)	1.0 μ l
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)	0.4 μ l
2 μ l cDNA (来自于第一链合成反应)	2.0 μ l
灭菌蒸馏水	至 50 μ l

2. 变性: 94°C 加热 2 分钟。

3. 进行 15 个到 40 个 PCR 循环。退火和延伸条件需要根据 Taq DNA 聚合酶而设定。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。