

Superbrilliant[®] 第五代高效耐热反转录酶**Superbrilliant[®] 5^{Gen} Super-Efficient Thermostable Reverse Transcriptase****Cat. No.: ZS-M14006**

组分

货号	名称	ZS-M14006S (2000U)	ZS-M14006M (10KU)	ZS-M14006L (50KU)
103053	5 ^{Gen} Super-Efficient Thermostable Reverse Transcriptase (200 U/μl)	10μl	50μl	250μl
103016	10×RT Buffer	100μl	500μl	1ml x 5
	说明书	1份	1份	1份

储存: -20°C 可保存 3 年。

简介: 第五代高效耐热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。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, 可以避免普通的 M-MuLV 反转录酶(RNase H-)在 37°C 反应时的一些不足。第五代高效耐热反转录酶具有灵敏度高、特异性高、合成能力高(较多的全长 cDNA), 热稳定性好和半衰期长的特点。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。高温反转录对于高 GC 含量 RNA 的反转录, 能有效减少二级结构, 提升反转录效率。该酶去除了 RNase H 活性, 不能够选择性剪切 RNA 和 DNA 杂合双链中的 RNA, 从而避免反转录过程中降解 RNA。在通读 GC 含量高, 二级结构复杂的 RNA 模板和反转录长片段 cDNA 等方面的表现突出。精心优化的反应 Buffer 使逆转录酶应用范围更广, 对后续的 PCR 以及定量 PCR 实验兼容性高。合成的 cDNA 第一条链后续可以用于 PCR、real-time PCR、cDNA 第二条链的合成等。也可以用于 DNA 探针的标记, 通过引物延伸来分析 RNA, 以及用于基因芯片荧光探针的标记。

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。

操作方法

1. 按以下组分配制反应体系

5 ^{Gen} Super-EfficientThermostable Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0.25-1 μl
10×RT Buffer	2 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Total RNA or Poly(A) RNA	0.1-2 μg
20×Oligo dT(25) &Random Primer *	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
RNase Free H ₂ O	Up to 20 μl

*注：Oligo dT(25)使用浓度为 20~50μM,如使用 Random9 随机引物可使用 125μM，基因特异性引物可使用 5μM。

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 For ever

*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 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。

常见问题

1. 总 RNA 反转录产物电泳观察不到。

a. 反转录产物由于是从模板反转录而获得，而模板的量本身比较低，反转录的量通常还要少于模板量，并且总 RNA 的反转录产物大小很不均匀，因此通常总 RNA 的反转录产物直接电泳观察是观察不到的。

2. 反转录产物通过 PCR 扩增没有特异性条带。

a. PCR 扩增没有获得特异性条带时建议先使用 actin、GAPDH 等作为内参进行 PCR 扩增，看是否可以成功扩增。如果可以成功，则说明 PCR 扩增体系没有问题，此时通常是目的基因的引物设计欠佳，当然也有可能是反转录产物质量欠佳。如果内参不能被很好地扩增，则有可能 PCR 体系存在问题或反转录产物质量欠佳。

b. 模板 RNA 发生了降解。哺乳动物细胞或组织的总 RNA 琼脂糖电泳后应该可以看到清晰的 18S 和 28S rRNA 条带，并且 28S rRNA 和 18S rRNA 的亮度比例应该大于等于 2.0。如果比例小于 2.0，则提示总 RNA 发生了显著的降解，最好能重新制备总 RNA 样品。避免 RNA 降解的主要方法是，严格进行 RNA 的相关操作，包括带洁净手套、戴一次性口罩、在洁净环境中抽提或制备 RNA，以尽量避免 RNase 污染。

c. 模板 RNA 的纯度偏低。在提取纯化 RNA 的过程中，残留在溶液中的一些成分如苯酚、SDS、EDTA、胍盐、磷酸、焦磷酸、多胺、亚精胺等会抑制反转录酶活性。对 RNA 样品进行柱纯化，或者进行沉淀、洗涤和再溶解，通常可以有

效去除残留的污染物。通常选择使用中实 Trizol 抽提获得的总 RNA 完全可以满足反转录反应的需要。

d. 反转录反应的模板量不足。在抽提获得总 RNA 后, 在进行一些精细的定量检测时通常会进行 DNase I 消化, 以充分去除可能的残留的 DNA 的干扰。DNase I 进行热失活时, 需要加入 EDTA 至终浓度为 2.5mM, 否则 RNA 在没有螯合剂的情况下, 在加热过程中容易被水解, 从而导致模板量不足。此外, 扩增特定基因时, 需要先查询该基因的组织分布特点, 利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和 PCR 扩增, 通常会由于模板量过少而 PCR 扩增失败。

e. 没有使用适当的反转录引物。对于细菌 RNA 和不含 poly(A)尾巴的 RNA, 要用 random hexamer 引物代替 Oligo(dT)18 引物。使用基因特异性反转录引物时, 需要确保基因特异性引物设计合理正确。

f. 如果 RNA 模板富含 GC 或容易形成二级结构, 此时可以考虑把反转录温度提高到 45-55°C。