

Transcript® IV Reverse Transcriptase [M-MLV, RNase H⁻] (Anti Inhibition High Temperature RT)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AW101

保存: -20°C保存两年。

浓度: 200 units/μl

产品说明

Transcript® IV Reverse Transcriptase 是经基因改造后在大肠杆菌中表达纯化得到的M-MLV高温反转录酶, 具有宽广的反应温度 (42°C-65°C) 和超高的热稳定性, 以及较强的抗抑制能力, 无RNase H活性。该酶可在42°C-65°C(高温有利于打开RNA二级结构)条件下合成第一链cDNA, 最佳反应温度50°C, 具有**抗抑制能力强**、**反应速度快**、灵敏度高、特异性高、聚合能力强(较多的全长cDNA)、热稳定性高和半衰期长的特点。

特点

- 适用范围广: 可以降解严重的RNA为模板进行反转录。
- 抗抑制能力强: 对RNA中残留的抑制剂具有良好的抗性。
- 反应速度快: 10分钟即可完成逆转录过程。
- 合成能力强: 合成长度可达20 kb。
- 热稳定性高: 反应温度42°C-65°C。
- 灵敏度高: 对微量RNA具有超强的检出率。

适用范围

- 高拷贝、低拷贝基因检测。
- 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。
- 适用于难以处理的样本RNA: 降解的RNA模板和有RT酶抑制剂的RNA模板。
- cDNA文库构建, 引物延伸, 3'和5'RACE。

产品组成

Component	AW101-02
Transcript® IV Reverse Transcriptase	10000 Units
10×TS IV RT Buffer	100 μl
Anchored Oligo(dT) ₂₀ Primer (0.5 μg /μl)	50 μl

使用前, 请将各组分点甩离心。

第一链cDNA合成

1、加入

Component	Volume
Total RNA/mRNA	0.1 ng-5 μg/ 10 pg-500 ng
Anchored Oligo(dT) ₂₀ Primer (0.5 μg/μl)	1 μl
or Random Primer (0.1 μg/μl)	1 μl
or GSP	2 pmol
10 mM dNTPs	1 μl
10×TS IV RT Buffer	2 μl
Ribonuclease Inhibitor	0.5 μl
Transcript® IV Reverse Transcriptase	1 μl
RNase-free Water	Variable
Total volume	20 μl

2、轻轻混匀

- 如用Anchored Oligo(dT)₂₀或基因特异引物(GSP), 50°C孵育 10分钟。
- 如用Random Primer (N9), 25°C孵育10分钟后, 50°C孵育 10分钟。
- 对于高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板, 可适当升高反应温度 (≤65°C)。



3、85°C加热5秒钟失活*TransScript*[®] IV Reverse Transcriptase。

推荐qPCR体系与条件 (以20 μl 反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
2× <i>PerfectStart</i> [™] Green qPCR SuperMix	10 μl	1×
Passive Reference Dye (50×) (optional)	0.4 μl	1×
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	20 μl	-

qPCR (三步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 50-60°C 15 sec ★
 72°C 10 sec ★

40-45 cycles

qPCR (两步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 60°C 30 sec ★

40-45 cycles

Dissociation Stage

Dissociation Stage

对于ABI仪器，荧光信号采集步骤（三步法中可以是退火或是延伸步骤）的时间如下

- ★使用ABI Prism7700/7900时，采集时间设定为30秒；
- ★使用ABI Prism7000/7300时，采集时间设定为31秒；
- ★使用ABI Prism7500时，采集时间设定为34秒；
- ★使用ABI ViiA 7时，采集时间设定为至少19秒。

高扩增效率选择三步法。高特异性选择两步法。

推荐PCR体系与条件 (以20 μl 反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
2× <i>TransTaq</i> [®] HiFi PCR SuperMix II	25 μl	1×
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 μl	-

PCR

94°C 2-5 min
 94°C 30 sec
 50-60°C 30 sec
 72°C 1-2 kb/min
 72°C 5-10 min

35-40 cycles

注意事项

- 避免RNase污染。
- 对于复杂RNA模板，或为了获得更高的合成效率，建议将RNA模板、引物与RNase-free Water混匀，65°C 孵育5分钟后，冰浴2分钟，然后再加入其它反应组分。
- 一步混匀所有的反应组分可以成功完成大多数反转录反应。对于复杂RNA模板，或为了获得更高的合成效率，建议按照说明书增加模板与引物的热孵育步骤。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

