Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号： ER181010

TIANScript II M-MLV

TIANScript II M-MLV逆转录酶

目录号：ER107

产品内容

产品组成	ER107-01 (25 rxn)	ER107-02 (100 rxn)
TIANScript II RTase (200 U/μl)	25 μl	100 μl
5×TIANScript II RTase Buffer	150 μl	500 μl

储存条件

-20℃可保存1年。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介

TIANScript II RTase 是由一个 71 kDa 的单亚基组成的 DNA 逆转录聚合酶。可以催化以 RNA 或 DNA；RNA 杂交链为模板的互补 DNA 的聚合反应。TIANScript II RTase 为改良后的莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶（M-MLV），改良后的酶具有更高的模板亲和力和更低的 RNase H 活性，因此使其在 cDNA 第一条链的合成过程中具有通读复杂二级结构模板和反转录长片段 cDNA 的能力。产品中配备的 5× TIANScript II RTase Buffer 经过精心的优化，既保证了新型逆转录酶的高效酶活，又拓宽了 RNA 模板量的加入范围，使得反转录出来的 cDNA 具有更好的质量以便用于后续的实验分析。

产品特点

酶活效率高：高效的逆转录酶活性，后续实验兼容性好；
底物范围广：适用于所有 RNA，尤其是具有复杂二级结构的 RNA 模板；
反转片段长：cDNA 第一链合成可以达 12 kb。

适用范围

1. cDNA 第一链的合成；
2. cDNA 文库的构建；
3. 一步法 RT-PCR；
4. RACE 分析。

产品来源：

重组 *E.coli* 菌株，含有从莫洛尼氏鼠中克隆的改良后的莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶基因。

活性单位：

1 单位活力定义为在 37℃、10 分钟内，以 polyA-poly(dT)12-18 作为模板和引物，将 1 nM dNTP 掺入到酸不溶物质所需的酶量。

操作步骤

用TIANScript II M-MLV合成第一链cDNA

1. 将模板RNA在冰上解冻；引物、5× TIANScript II RTase Buffer、dNTP混合液和RNase-free ddH_2O在室温（15-25℃）条件下解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

2. 按照下表的体系在冰浴的无核酸酶的离心管中配制混合液：

组分	体积（μl）
RNA	1 ng-2 μg Total RNA 或1 pg-2 ng Poly(A) mRNA
Primer	2 μl Oligo-dT (10 μM) 或2 μl Random Primer (10 μM) 或10-15 pmol 基因特异性引物
dNTPs (10 mM, Each)	1
RNase-free ddH_2O	补充至14.5

3. 65℃孵育5 min，然后置于冰上2 min。

4. 在上述反应液的基础上继续加入下表所列的反转录组分：

组分	体积（μl）
上述反应液	14.5
5×TIANScript II RTase Buffer	4
RNasin (40 U/ μl)	0.5
TIANScript II RTase (200 U/ μl)	1
总体积	20

5. 如果引物为Random Primer则需将体系先在25℃下孵育10 min，如果引物为Oligo-dT或者基因特异性引物则不需要此步骤。

6. 42℃孵育60 min。

7. 85℃加热5 min（或70℃加热15 min）终止反应，置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

注意事项：请务必在使用本产品之前阅读此注意事项。

1. 本产品并未提供dNTP混合液和RNasin（RNase抑制剂），客户需要另外购买；
2. 用于cDNA合成反应的溶液试剂尽可能用DEPC进行处理，并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时，首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后，再将溶液进行滤除菌处理；
3. RNA样品要避免基因组DNA污染；
4. 避免反复冻融RNA，使RNA保持在冰浴中处融化状态；
5. 试剂盒中各组分成分应在-20℃保存；
6. 在使用Random Primer时，要注意随机引物量和总RNA量之间的关系，一般建议50 ng随机引物/5 μg总RNA。当提高Random/RNA的比率将会提高短片段（～500 bp）cDNA的合成；而当降低Random/RNA的比率将会提高长片段cDNA的合成；
7. 如果模板RNA富含二级结构，可以先在65℃条件下处理5 min；
8. 如果反转录中使用PCR下游引物，为了防止引物错配导致的非特异扩增，可以在50℃条件下进行反转录；
9. 在进行长片段扩增时，为了防止cDNA结果被破坏，建议以70℃下处理15 min为酶灭活条件；
10. 当使用酶类时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部，由于酶粘度高，吸取时应慢慢吸取；
11. **特别注意：如果要扩增长片段，需使用新鲜提取所得的完整性好、纯度高的RNA。**