

Gold 逆转录酶

货号/规格: R3001/2,000U, R3002/10,000U

产品简介

Gold 逆转录酶是通过基因重组技术改造 M-MLV 得到的耐热逆转录酶, 具有更高的热稳定性, 可在 37°C-55°C 条件下合成第一链 cDNA。同时该酶去除了 RNaseH 活性, 对于常见的逆转录反应抑制剂具有较高的耐受度, cDNA 合成能力更强, 可用于复杂二级结构的 RNA 逆转录, 能够合成较长的 cDNA 以及构建高比例的全长 cDNA 文库等。

产品组成

Component	R3001 (2,000U)	R3002 (10,000U)
Gold 逆转录酶 (200U/μl)	10 μl	50 μl
5X Gold Buffer	100 μl	500 μl

活性定义

以 Poly (rA) · Oligo (dT) 为模板/引物, 在 37°C, 10 min 条件下, 使 1 nmol 的 dTTP 掺入酸性沉淀物质所需要的酶量定义为 1 个活性单位(U)。

保存条件

-30~-15°C 保存。

应用举例

第一链 cDNA 合成

1. 配制反应体系

按以下体系于 RNase-free 的离心管中配制逆转录反应液:

Component	Amount	Final Conc.
Oligo (dT) ₁₅ Primer (50 μM) ^[1] or Random Primer (100 μM) ^[1] or 特异性引物 (2 μM) ^[1]	1 μl	2.5 μM 5 μM 0.1 μM
Total RNA ^[2] or Poly A ⁺ RNA ^[2]	10 pg ~ 1 μg 10 pg ~ 100 ng	0.5 pg ~ 50 ng/μl 0.5 pg ~ 5 ng/μl
5X Gold Buffer	4 μl	1X
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl	0.5 mM
Gold 逆转录酶 (200 U/μl)	1 μl	10 U/μl
RNase inhibitor (40 U/μl)	1 μl	2 U/μl
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μl	-

[1] 请根据实验需要选择合适的引物: Oligo dT 引物仅转录 mRNA, Random Primer 可转录所有类型的 RNA, 特异性引物仅转录特异的 RNA 片段。当后续实验为 qPCR 时, 建议混合使用 Oligo dT 和 Random Primer 各 1 μl, 提高定量结果的准确性。

[2] 若产物后续进行 PCR 反应, 则建议先对模板 RNA 进行变性处理打开二级结构, 有助于提高逆转录产物的产量。配置以下反应体系, 于 65°C 加热 5 min, 再置于冰上迅速冷却 2 min:

Component	Amount
Total RNA or Poly A ⁺ RNA	10 pg ~ 5 μg 10 pg ~ 500 ng
RNase-free ddH ₂ O	to 10 μl

2. 设定程序进行逆转录反应

将上述混合物充分混匀后按以下条件进行逆转录反应:

Temperature	后续为 PCR 反应	后续为 qPCR 反应
	Time	
25°C ^[1]	5 min	/
37°C ^[2]	45 min	15 min
85°C	5 sec	5 sec

[1] 仅当使用 Random Primer 时需要此步, 当使用 Oligo (dT)₁₅ Primer 或特异性引物时无需进行此步。

[2] 当模板 RNA 具有复杂的二级结构或者高 GC 含量时，可将温度提高至 50℃。

产物可立即进行 PCR、qPCR 反应，或保存于-20℃及以下环境中，并避免反复冻融。

注意事项

1. 请使用高质量的 RNA，保证逆转录反应的效率
2. 在逆转录反应中注意防止 RNase 污染

本品仅供科学研究使用。