

Transcript® Uni Reverse Transcriptase [M-MLV, RNase H](High Temperature RT)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AU101

保存: -20°C保存两年。

浓度: 200 units/μl

产品说明

Transcript® Uni Reverse Transcriptase是由基因改造筛选并在大肠杆菌中表达纯化得到的高温反转录酶, 具有宽广的反应温度(42°C-65°C)和超高的热稳定性, 且无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

- 超高热稳定性: 反应温度42°C-65°C。
- 高灵敏度、高特异性、高合成量、强聚合能力。
- Anchored Oligo(dT)₂₀设计独特, 能锚定紧邻mRNA Poly(A)+5'端的第一个碱基, 结合位点锚定, 特异性高, 保证第一链cDNA合成效率和成功率。
- 无RNase H活性, 避免了第一链cDNA合成反应中DNA/RNA杂交体中模板RNA被降解, 从而保证第一链cDNA合成量和长度。
- 合成片段≤20 kb。

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。
- cDNA文库构建、引物延伸、3'和5'RACE。

产品组成

Component	AU101-02
Transcript® Uni Reverse Transcriptase	10000 units
10×TS Uni 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 Uni RT Buffer	2 μl
Ribonuclease Inhibitor(50 units/μl)	0.5 μl
Transcript® Uni Reverse Transcriptase	1 μl
RNase-free Water	Variable
Total volume	20 μl

2、轻轻混匀

- 如用Anchored Oligo(dT)₂₀ Primer或基因特异引物(GSP), 50°C孵育30分钟。
- 如用Random Primer(N9), 25°C孵育10分钟后, 50°C孵育30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*[®] Uni 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 Prism 7700/7900时，采集时间设定为30秒； ★使用ABI Prism 7000/7300时，采集时间设定为31秒；

★使用ABI Prism 7500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

