

# High-Accuracy Reverse Transcriptase

REF: EG21104S

## 储运条件

-20°C

## 产品组成

| 组分   | 规格     |
|--|--------|
| High-Accuracy Reverse Transcriptase (200 U/μl) | 50 μl  |
| 5× M-MLV First Strand Buffer                   | 500 μl |
| 0.1 M DTT                                      | 100 μl |

## 产品简介

High-Accuracy Reverse Transcriptase 是通过基因修饰和重组技术克隆表达的 RNase H 活性缺失型莫洛尼氏鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV) 逆转录酶, 它利用核酸适配体技术, 通过共价键作用结合到 M-MLV 上, 能抑制 M-MLV 在 31°C 以下的活性, 从而提高产物特异性。经过基因工程改造, 本酶的最适反应温度提升至 50°C, 延伸能力更强, 可用于较长的 cDNA 合成。

## 活性定义

37°C条件下, 以 Poly(A)-Oligo(dT) 为模板 / 引物, 在 10 min 内, 掺入 1 nmol 的 [<sup>3</sup>H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

## 质量控制

### 宿主原性DNA检测

无宿主 DNA 污染。

### 核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h, 通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

### 核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

## 使用方法

### 第一链 cDNA 合成步骤

1. 于冰上配制如下反应体系:

| 试剂                      | 使用量              |
|-------------------------|------------------|
| 引物                      | X μl             |
| Oligo(dT) <sub>20</sub> | 终浓度 2.5 μM       |
| 或随机引物                   | 终浓度 2.5 ng/μl    |
| 或基因特异性引物                | 终浓度 0.25 μM      |
| 模板 RNA <sup>a</sup>     | 50 ng~1 μg/20 μl |
| dNTP Mix (10 mM Each)   | 1 μl             |
| Nuclease-Free Water     | To 13 μl         |

- a. 推荐使用试剂盒提取的已去除基因组 DNA 污染的高质量 RNA 作为模板。
2. 将以上混合液在 65°C 温育 5 min, 迅速取出置于冰上冷却 1 min;
3. 向反应混合液中继续加入:

| 试剂                                  | 使用量  |
|-------------------------------------|------|
| 5× M-MLV First Strand Buffer        | 4 μl |
| 0.1 M DTT                           | 1 μl |
| High-Accuracy Reverse Transcriptase | 1 μl |
| (可选) RNase Inhibitor (40 U/μl)      | 1 μl |

4. 轻柔吸打混匀后, 瞬离;
5. 若使用 Oligo(dT)<sub>20</sub> 或基因特异性引物, 50°C 温育 30 min; 若使用随机引物, 先 25°C 温育 5 min, 之后 50°C 温育 30 min;
6. 反应结束后, 85°C 温育 5 min 以终止反应;
7. 将获得的 cDNA 溶液置于冰上, 用于后续实验。

注: cDNA 溶液置于 -20°C 可保存半年; 置于 -80°C 可长期储存。