

# HotScript H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase

HotScript 高温型 M-MuLV 逆转录酶(RNase H 活性缺失)

## 使用说明书

目录号: OP102

| 目录编号     | 包装单位   |
|----------|--------|
| NS002-01 | 10KU   |
| NS002-02 | 5*10KU |

| 组成                                      | NS002-01 | NS002-02 |
|---|----------|----------|
| HotScript H <sup>-</sup> RTase(200U/μL) | 10KU     | 5×10KU   |
| 5× RT Buffer                            | 500μL    | 3×500μL  |

**产品储存:** 4°C运输, -20°C保存, 有效期 12 个月。

**产品浓度:** 200 units/μL

### 制品说明:

本制品使用通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 HotScript H<sup>-</sup> RTase。同时经过多点突变, 提高了反转录温度耐受性, 可以在高达 55-60°C 进行反转录(更高温度反转时活性会部分减低)。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H 活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA, 因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。

本制品 M-MuLV(RNase H<sup>-</sup>) 的 RNase H 活性缺失, 与 M-MuLV 相比, 具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高, 二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

**适用范围:** 第一链 cDNA 合成。可用于低拷贝基因的检测。

**制品特点:** 合成 cDNA 片段长度最高可达 12kb。

**第一链cDNA合成:** (以20μL反应体系为例)

1. 加入:

| Components   | Volume(20μL)     |
|--|------------------|
| Total RNA/mRNA   | 50ng-5μg/5-500ng |
| Oligo(dT)18(0.5μg/μL)or<br>Random Primer(0.1μg/μL) or<br>GSP(Gene Specific Primer) | 1μL              |
|  | 1μL              |
|  | 2 pmol           |
| dNTP Mixture (10mM each)   | 1μL              |
| 5× RT Buffer   | 4μL              |
| RNase Inhibitor(40 units/μL)   | 0.5μL            |
| HotScript H <sup>-</sup> RTase   | 0.8-1μL(见注意事项 3) |
| RNase-free Water to final volume   | 20μL             |

2. 轻轻混匀:

如用Oligo(dT)18或基因特异引物(GSP), 50°C-55°C孵育30-50min。

如用Random Primer, 23°C孵育10 min, 50°C-55°C孵育30-50 min。

3. 85°C加热5 min失活HotScript H<sup>-</sup> RTase。

**注意:** GC含量高(>50%)或者二级结构复杂模板, 可以提高反转录温度至60°C左右。

**RT-PCR:** 建议取1/10-1/5体积(2-4μL)的反转录产物作为PCR模板。

**建议PCR条件:** 以20μL或50μL反应体系为例)

| Components                         | Volume(20μL) | Volume(50μL) | Final Concentration |
|------------------------------------|--------------|--------------|---------------------|
| cDNA Template                      | 0.8μL        | 2μL          | as required         |
| Forward Primer(10μM)               | 0.4μL        | 1μL          | 0.2μM each          |
| Reverse Primer(10μM)               | 0.4μL        | 1μL          | 0.2μM each          |
| 10× Taq Buffer(含Mg <sup>2+</sup> ) | 2μL          | 5μL          | 1×                  |
| 2.5mM dNTPs                        | 1.6μL        | 4μL          | 0.2mM               |
| Taq DNA Polymerase                 | 0.2μL        | 0.5μL        | 2.5 units           |
| ddH <sub>2</sub> O to final volume | 20μL         | 50μL         | Not applicable      |

**PCR循环:**

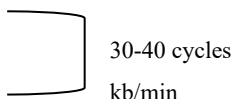
94°C: 2-5 min

94°C: 30 sec

50-60°C: 30 sec

72°C: 1-2

72°C: 5-10 min



**注意事项:**

1. 避免RNase污染，为保证反转录成功，建议使用高质量的RNA样品。
2. 如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构，可以先只加RNA模板、引物 and RNase-free Water混匀，65°C变性5分钟，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
3. HotScript H<sup>-</sup> RTase/RNase Inhibitor Mix非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照0.8μL使用，也不影响使用效果。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本制品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

=====



扫码关注我们