

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℃-55℃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℃, 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℃保存。

应用举例

A. 后续实验为 PCR

1. RNA 模板变性

按以下体系于 RNase-free 的离心管中配制反应液:

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

于 65℃加热 5 min, 再置于冰上迅速冷却 2 min。

* RNA 模板变性有助于打开二级结构, 可在很大程度上提高第一链 cDNA 的产量。对于长度超过 3 kb 的 cDNA 片段, 请勿省略变性步骤。

2. 配制第一链 cDNA 合成反应液

按以下体系于 RNase-free 的离心管中配制逆转录反应液:

Component	Amount
上一步的反应液	10 μl
5X Gold Buffer	4 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
Gold 逆转录酶 (200 U/μl)	1 μl
RNase inhibitor (40 U/μl)	1 μl
Oligo (dT) ₁₅ Primer (50 μM) ^[1]	
/ Random Primer (100 μM) ^[1]	1 μl
/ 特异性引物 (2 μM) ^[1]	
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。

用移液器轻轻吹打混匀。

3. 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	Time
25℃ ^[1]	5 min
37℃ ^[2]	45 min
85℃	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 反应，或保存于-20℃及以下环境中，并避免反复冻融。

B. 后续实验为 qPCR

1. 配制第一链 cDNA 合成反应液

按以下体系于 RNase-free 的离心管中配制逆转录反应液：

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

[1] 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. 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	Time
37℃ ^[1]	15 min
85℃	5 sec

[1] 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域，可将反应温度提高至 50℃，有助于提高产量。

产物可立即进行 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。