



RobustScript II 反转录酶

组分	#M0351	#M0352
RobustScript II 反转录酶 (200 U/μl)	10 μl	50 μl
5 × 第一链合成缓冲液	1000 μl	1000 μl
0.1 M DTT	500 μl	500 μl

概述：RobustScript II反转录酶是基因工程改造后的M-MLV反转录酶(莫洛尼氏鼠白血病病毒pol基因)，降低了RNA酶H活性，增强了热稳定性。该酶可以用来合成cDNA第一链，同传统的M-MLV RT相比，该酶在温度升高时有更好的特异性，cDNA的产量更高。RobustScript II反转录酶可合成cDNA的最高长度达12 kb。

贮存溶液：20 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0.01% Nonidet™ P-40 (NP-40) (V/V), 50%甘油(V/V)。

单位定义：1单位指以poly(A)为模板、oligo(dT)₂₅为引物，在37°C条件下，10分钟内催化1 nmol的dTTP掺入形成酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

第一链cDNA的合成：

以下20 μl的反应体系可以用于反转录1 ng-5 μg总RNA或1-500 ng mRNA

1. 将以下组分加入无核酸酶的微量离心管中：

1 μl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μg/mL)或50-250 ng随机引物或2 pmole基因特异性引物

1 ng-5 μg总RNA或1-500 ng mRNA

1 μl 10 mM dNTP混合物(dATP, dGTP, dCTP和dTTP均为10 mM)

加入灭菌蒸馏水至12 μl

2. 混合物在65°C加热5分钟后，迅速置于冰上。短暂离心收集组分后，加入：

4 μl 5× 第一链合成缓冲液

2 μl 0.1 M DTT

1 μl RNase抑制剂*(40 U/μl)。

*注：RNase抑制剂不随酶附送，需要单独采购。如果起始RNA的量小于50 ng，则必须加入RNase抑制剂

3. 用枪头反复吸打混匀组分，如果使用oligo(dT)₁₂₋₁₈引物，应42°C下孵育2分钟；如果使用的是随机引物，应在25°C下孵育5分钟。

4. 加入1 μl RobustScript II反转录酶轻轻上下颠倒混匀。如果您使用的RNA不足1 ng，减少RobustScript II反转录酶添加量至0.25 μl，并加入灭菌蒸馏水至终体积为20 μl。

5. 42°C孵育50分钟。

6. 70°C加热15分钟以终止反应。

PCR反应体系和程序：

1. 在PCR反应管中加入下列成分：

10× PCR缓冲液[200mM Tris-HCl (pH 8.4 @ 25°C), 500 mM KCl] 5 μl

50mM MgCl₂ 1.5 μl

10mM dNTP混合物 1 μl

上游扩增引物 (10 μM) 1 μl

下游扩增引物 (10 μM) 1 μl

Taq DNA聚合酶 (5 U/μl) 0.4 μl

2 μl cDNA (来自于第一链合成反应) 2 μl

灭菌蒸馏水 至50 μl

2. 变性: 94°C加热2分钟。

3. 进行15个到40个PCR循环。退火和延伸条件需要根据Taq DNA聚合酶而设定。

RobustScript II 反转录酶

质量控制检测:

核酸内切酶活性: 50 µl反应体系中, 500 U本酶与1 µg的pUC19质粒于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

核酸外切酶活性: 50 µl反应体系中, 2000 U本酶与1 µg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

RNase活性: 25 µl反应体系中, 1000 U本酶与250 ng的大肠杆菌rRNA于37°C温育2小时, 经琼脂糖电泳检测, 被降解的rRNA小于1%。

纯度: 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于90%。

注意事项:

使用时宜存放在冰盒或冰浴上, 使用完毕后立即放置于-20°C保存。

参考文献:

1. Kotewicz M.L., D'Alessio J.M., Driftnier K.M., Blodgett K.P., and Gerard G.F. (1985) *Gene* 35, 249.
2. Gerard G.F., D'Alessio J.M., Kotewicz M.L., and Noon M.C. (1986) *DNA* 5, 271.
3. Houts G.E., Miyagi M., Ellis C., Beard A., and Beard J.W. (1979) *J. Virol.* 29, 517.
4. Kotewicz M.L., Sampson C.M., D'Alessio J.M., and Gerard G.F. (1988) *Nuc.Acids Res.* 16, 265.