货号：PM05

Neoscript RTase 1ST Strand cDNA Synthesis Kit

2023V01

BiOri 宝锐生物

产品概述

本试剂盒提供了所有用于 cDNA 第一链合成的试剂。其中 Neoscript RTase 是由 Moloney 鼠白血病病毒来源的 M-MLV 基因经突变筛选、并通过大肠杆菌重组表达获得的逆转录酶，该酶去除了 RNase H 活性，具有更高的温度耐受性，适用于高温反转录，有利于消除 RNA 高级结构与非特异性因素对 cDNA 合成的不利影响，具有更高的稳定性和反转录合成能力，其对 cDNA 第一链合成的片段长度可以达 12 kb。

试剂组成

1. 200 U/μL Neoscript RTase
2. 5×First-Strand Buffer
3. 40 U/μL RNase Inhibitor
4. Oligo$(dT)_{18}$ Primer（50 μM）
5. Random 6 mers（50 μM）
6. 10mM dNTP Mix

活性定义

以 poly(A)•Oligo$(dT)_{25}$ 为模板/引物，在 37°C条件下，10 min 内掺入 1 nmol 的 dTTP 所需的酶量为 1 个活性单位（U）。

保存条件

-20°C长期保存，使用前应混匀，避免反复冻融。

质量控制

1. SDS-PAGE 电泳纯度大于 98%。
2. 扩增灵敏度、批间差异、稳定性。
3. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

第一链的合成

1. 参考下表进行体系配制。

试 剂	20 μL 体系	终浓度
Oligo$(dT)_{18}$ Primer（50 μM）	1 μL	2.5 μM
Or　Random 6 mers（50 μM）*	1 μL（0.4~2 μL）	2.5 μM（1~5 μM）
Or　Gene specific Primer（10 μM）*	0.2~2 μL	0.1~1 μM
10 mM dNTP	1 μL	0.5 μM
Template RNA	——	total RNA ≤ 5 μg；mRNA ≤ 1 μg
RNase-free dH_2O	To 10 μL	——

*2 kb 以下的 cDNA 合成时，Random 6 mers 的使用量为 1~2 μL；2 kb 以上的 cDNA 合成时，Random 6 mers 的使用量为 0.4~1 μL。也可使用 Gene specific Primer，此时其在反应体系中的终浓度为 0.1~1 μM。

2. 65°C加热 5 min，冰上迅速降温 2 min。
3. 在上述体系中再加入以下组分，至总体积为 20 μL，轻轻混匀。

试 剂	20 μL 体系	终浓度
5×First-Strand Buffer	4 μL	1×
200 U/μL Neoscript RTase	1 μL	10 U/μL
40 U/μL RNase Inhibitor	0.5 μL	1 U/μL
RNase-free dH_2O	To 20 μL	——

4. 按如下条件进行反应。
   (1) 如使用 Random Primer 随机引物，应先于 25°C温浴 10 min；然后 50°C温浴 30~60 min；
   (2) 如使用 Oligo dT 或特异性引物，则于 50°C温浴 30~60 min。
5. 95°C加热 5 min（或 70°C加热 15 min）灭活 Neoscript RTase，终止反应。
6. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，或置于-20°C长期保存。

技术说明

1. 高纯度完整的 RNA 模板对于逆转录高质量及完整的 cDNA 链非常关键。RNA 模板制备过程中会带入少量基因组 DNA，这些 DNA 可能会随着目标基因一起扩增，如果扩增要求完全无基因组 DNA 污染，则建议使用 DNase Ⅰ进行预处理。
2. RNase Inhibitor 的加入能够有效抑制核酸酶对 RNA 模板的降解作用。
3. 在进行长片段扩增时，为了防止 cDNA 结构被破坏，建议逆转录酶的灭活条件设置为 70°C处理 15 min。
4. 当扩增条带亮度较弱时，建议适当提高 RNA 模板浓度及引物浓度。
5. Neoscript RTase 具有更好的稳定性，适用于 42~55°C范围内进行逆转录。当扩增具有复杂结构区域的 RNA 时，可通过提高逆转录温度来增加反应的特异性。
6. 适用于 cDNA 文库构建。
7. 3’和 5’RACE。
8. 扩增前后请使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换；PCR 反应完成后切勿打开反应管，以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。