

RobustScript III反转录酶

组分	#M0371	#M0372
RobustScript III 反转录酶 (200 U/μl)	20 μl	100 μl
5 × 第一链合成缓冲液	400 μl	2000 μl
0.1 M DTT	200 μl	1000 μl

概述：RobustScript III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。由于RobustScript III反转录酶可以在高至55°C下合成cDNA第一链，从而能得到比其它的反转录酶特异性更好、产量更高的cDNA，并且更多的全长cDNA。RobustScript III反转录酶可合成从100 bp到12 kb以上的cDNA。

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

5× 第一链合成缓冲液：250 mM Tris-HCl (pH 8.3 @ 25°C)，375 mM KCl，15 mM MgCl₂。

单位定义：1单位指以poly(A)为模板，oligo(dT)₂₅为引物，在37°C反应10分钟可以将1 nmole的dTTP掺入酸不溶物中的酶量。

第一链cDNA的合成：

以下20 μl 的反应体系可以用于反转录10 pg-5 μg总RNA或10 pg-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)₂₀ (50 μM)或200–500 ng oligo(dT)₁₂₋₁₈ 或50–250 ng随机引物或2 pmole基因特异性引物

10 pg-5 μg总RNA或10 pg-500 ng mRNA

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

加入灭菌蒸馏水至13 μl

2. 混合物在65°C加热5分钟后，迅速置于冰上冷却至少1分钟。

3. 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)

1 μl RobustScript III*(200 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

†注：对于长cDNA片段(>5 kb)，使用oligo(dT)₂₀或基因特异性引物在50°C之上反应时，增加RobustScript III的用量至400U(2 μl)可以增加cDNA的产量

4. 用枪头反复吸打混匀组分，如果使用的是随机引物，应在25°C下孵育5分钟。

5. 50°C孵育30-60分钟，如果使用基因特异性引物、复杂模板或富含二级结构的模板需将反应温度增加到55°C。

6. 在70°C加热15分钟以终止反应。

cDNA产物可以直接作为PCR的模板。如果扩增的PCR产物大于1 kb，则需要去除与cDNA互补的RNA。可以使用1 μl(2 U)的*E.coli* RNA酶H在37°C孵育20分钟以去除与cDNA互补的RNA。

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



RobustScript III反转录酶

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模板和引物而设定。
- 此外, 为得到最好的扩增效果, 需要针对引物和模板调整MgCl₂浓度。

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:

将所有的组分保存于-20°C冰箱。在使用前将5× 第一链合成缓冲液和0.1 M DTT在室温解冻, 用完后迅速重新冰冻。

参考文献:

1. Kotewicz M.L., D'Alessio J.M., Driftmier 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.