

描述: HaiGene Max65 反转录酶 (Max65 RTase)通过 M-MuLV RTase 体外进化而得。该酶具有 RNA 依赖性的 DNA 聚合酶活性, 并且减弱了内置的 RNaseH 活性。与野生型 M-MuLV RT 相比, 该工程化酶具有显著改善的热稳定性、扩增稳健性、高合成速率。Max65 RTase 能够在宽范围温度 (37~65°C) 下, 进行可重现的 cDNA 合成。

由于具有较高的热稳定性, Max65 RTase 在整个反转录反应过程中保持完整活性, 产生较高得率的 cDNA, 能够合成>6kb 的 RNA 转录本。反应温度可提升至 65°C, 以高效转录具有复杂二级结构的 RNA 区域, 反转录酶反应可以在 15 至 30 分钟内完成。

组分

名称	5KU	25KU
Max65 RTase	1 bead	5 beads
5×Max65 RTBuffer	0.2 ml	1 ml
HGStoreBuffer25	1 ml	1 ml

单位定义: 以 poly(rA)为模板、oligo(dT)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, 定义为一个活性单位。

储存与运输:

- (1)核心酶制品为冻干品形态, 未开封状态下[-15°C 以下(效期 36 个月)];
- (2)酶制品使用 HGStoreBuffer25 溶解后[-15°C 以下(效期 12 个月)];
- (3)酶制品使用 ddH₂O 溶解后[-15°C 以下(效期 2 个月)], [-60°C 以下(效期 12 个月)]。
- (4)运输条件: 室温(<37°C), 28 天以内。收到货物后-15°C 以下保存。

使用前事项:

- (1)用于冻干酶的溶解液 (HGStoreBuffer25): 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 25% Glycerol, 0.1% Tween20。除此外, 也可使用 ddH₂O 溶解酶制品。

- (2)溶解: 冻干酶以冻干球 (直径 3.6mm) 形态提供, 每个球包含 5KU 的 Max65 RTase, 每个球用 48 μl 的 HGStoreBuffer25 溶解, 总体积为 50 μl (每个冻干球溶解后, 实际体积约 2 μl)。此时, 溶解后的 Max65 RTase 为 100U/μl。
- (3) 1×Max65 RTBuffer: 含 5 mM DTT, 5 mM Mg²⁺。

操作方法

1. 根据 RNA 种类配制引物模板退火体系

加入模板 RNA:

or Total RNA 1 pg~5 μg

or poly(A) RNA 0.1 pg~0.5 μg

加入逆转录引物:

Oligo(dT)23 (50pmol/μl)

or Random Hexamer(100pmol/μl) 1 μl

or Gene-Specific Primer (10pmol/μl)

dNTP Mixture (10 mM each) 1 μl

RNase Free H₂O up to 13.5 μl

放入 PCR 仪, 95°C 20s, 30 度 1min。使引物和 RNA 模板在含有 dNTP 的情况下退火。

2. 向上述退火 RNA 中加入酶与 Buffer

5×Max65 RTBuffer 4 μl

RNase Inhibitor (40 U/μl) 0.5 μl

Max65 RTase (100U/μl) 2 μl

混合均匀后, 放置在 PCR 仪上进行反转录反应

37°C 5 min (短引物配对)

50°C 10 min (高效逆转录)

65°C 5 min (长 cDNA 的逆转录)

85°C 5 min (失活反应)

注意: 65°C 的逆转录反应是非必须的, 可以省略。对于>4000nt 的 cDNA, 或含有高 GC 含量的 cDNA, 推荐设置此步骤。

3. 反转录所得的 cDNA 可直接用于 PCR 反应或储存于 -20°C。

4. 其它注意事项: 该酶可与 Taq DNA 聚合酶组合, 用于 One-Step RT-PCR, 推荐的 RT 温度为 50-65°C, RT 时间为 5min, 酶的参考用量为: 终反应浓度 1~2U/μl。