

描述: HaiGene Max65 反转录酶 (Max65 RTase)通过 M-MuLV RTase 体外进化而得。该酶不仅具有 RNA 依赖性的 DNA 聚合酶活性,还具有 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	10kU	50kU
Max65 RTase (200U/μl)	50 μl	250 μl
5×Max65 RTBuffer	0.4 ml	1.8 ml

(1) 1×Max65 RTBuffer: 含 5 mM DTT, 5 mM Mg²⁺。

(2) 酶储存溶液: 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% Tween20, 50%Glycerol。

(3) 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。

(4) 储存: -20°C 可保存 3 年。

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:

or Oligo(dT)23 (50pmol/μl) 1 μl

or Random Hexamer(100pmol/μl) 1 μl

or Gene-Specific Primer (10pmol/μl) 1 μl

dNTP Mixture (10 mM each) 1 μl

RNase Free H₂O up to 14.5 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 (200U/μl) 1 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 1U/μl。