

Version: AG 3.2 (2021.04.01修订)

SPARKscript II H⁻ Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)

目录号: AG0102

01/产品组分

序号	组分	AG0102
		50 rxn(20μL/rxn)
1	SPARKscript II H ⁻ RTase (200 U/μL)	10000 U
2	5×RT Buffer	500 μL

02/保存条件

本产品所有组分-20℃保存。

03/产品概述

本产品是通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H⁻活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 SPARKscript II H⁻ RTase。同时经过多点突变提高了反转录温度耐受性，可以在高达 55-60℃进行反转录（更高温度反转时活性会部分减低）。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H⁻活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA，因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。本酶 M-MuLV (RNase H⁻) 的 RNase H⁻活性缺失，与 M-MuLV 相比，具有更强的延伸能力和稳定性，可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高、二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

04/适用范围

第一链 cDNA 合成；可用于低拷贝基因的检测。合成 cDNA 片段长度最高可达 12 kb。

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 避免 RNase 污染。
- ◇ 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
- ◇ 如果 RNA 模板 GC 含量丰富或者有复杂二级结构，可以先只加 RNA 模板、引物和 RNase Free H₂O 混匀，65℃变性 5 分钟，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
- ◇ SPARKscript II H⁻ RTase 非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请短暂离心，并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照 0.8 μL 使用，也不影响使用效果。

06/第一链cDNA合成

以20 μL反应体系为例：

1. 将模板 RNA 在冰上解冻，RNase Free H₂O 在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上，所有组分置于冰上备用。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 按照下表配制混合液，建议使用 PCR 管冰上配制：

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5 μg/5-500 ng
Oligo (dT) ₁₈ (0.5 μg/μL) or	1 μL
Random Primer (0.1 μg/μL) or	1 μL
GSP (Gene Specific Primer)	2 pmol
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μL
5×RT Buffer	4 μL
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL
SPARKscript II H ⁻ RTase	0.8-1 μL
RNase Free H ₂ O	up to 20 μL

3. 轻轻混匀。
 - ▲ 如用 Oligo (dT)₁₈ 或基因特异引物 (GSP)，50℃-55℃ 孵育 30-50 min。
 - ▲ 如用 Random Primer，25℃ 孵育 10 min，50℃-55℃ 孵育 30-50 min。
4. 85℃ 加热 5 min 失活 SPARKscript II H⁻ RTase。
 - ▲ 注意：GC 含量高 (>50%) 或者二级结构复杂模板，可以提高反转录温度至 60℃ 左右。

07/RT-PCR

建议取 1/10-1/5 体积（2-4 μL）的反转录产物作为 PCR 模板。

08/建议的PCR体系

以50 μL反应体系为例

Components	Volume	Final Concentration
cDNA Template	2 µL	as required
Forward Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM each
Reverse Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM each
10×Taq Buffer (含Mg ²⁺)	5 µL	1×
2.5 mM dNTPs	4 µL	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.5 µL	2.5 U
RNase Free H ₂ O	up to 50 µL	

09/PCR反应循环的设置

94℃:	2-5 min	} 30 cycles
94℃:	30 sec	
50-60℃:	30 sec	
72℃:	1-2 kb/min	
72℃:	5-10 min	

10/相关产品

- AC0101 SparkZol Reagent
- AC0202 SPARKeasy组织/细胞RNA快速提取试剂盒 (含基因组DNA清除柱)
- AC1705 高效固体表面RNase清除剂
- AC1709 RNase Free and DNase Free纯水
- AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)
- AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

