

TGIRT-III Reverse Transcriptase

Cat. No.: D0310 Store at: -20°C



描述: TGIRT-III RTase 具有依赖于 DNA/RNA 杂交链的反转录酶活性,能快速合成 cDNA,该酶具有强的链转换活性 (Switch)。因此该酶可用于 tRNA、ncRNA、miRNA 等核酸分子的同步逆转录和加接头 (template-switching reaction, 用于 TGIRT-Seq)。TGIRT-III RTase 具有极强的延伸性能,因此更易获得全长的 cDNA。除此外,该酶具有的强 switch 活性,使得可以利用 RNA 的 5'端帽结构进行 SMART 建库 (SMART-Seq)。该酶的反应温度为 37-55°C,最佳反应温度为 50°C。

组分

名 称	500 pmol
TGIRT-III RTase (10 pmol/μl)	50 μl
5×TGIRT Buffer	0.5 ml
100mM DTT	100 μl
10XDuplex Buffer	0.5 ml

储存: -20°C 可保存 2 年。

(一) 标准逆转录-操作方法

RNA	1-1000ng
10μM 反转录引物	0.5 μl
5×TGIRT Buffer	4 μl
100mM DTT	1 μl
10mM each dNTPs	2 μl
RNaseOUT-RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl
TGIRT-III RTase (10 pmol/μl)	1 μl
Rnase Free H ₂ O Upto	20 μl

混合均匀后 50°C条件下反应 10-60min (由于 TGIRT-III 具有极快的转录速度,多数情况下使用 5min 即可获得目标 cDNA)。

(二) Template-Switching 操作方法

2.1 制备 DNA/RNA 退火 Duplex

10XDuplex Buffer	2 μl
10μM R1R2 comp DNA	2 μl
10μM R1R2 RNA	2 μl
Rnase Free H ₂ O Upto	14 μl

混合均匀后 82°C 2min, 逐步降温到 25 度, 形成退火 DNA/RNA Duplex (此时浓度为 1μM)。

2.2 进行 Template-Switch 反应

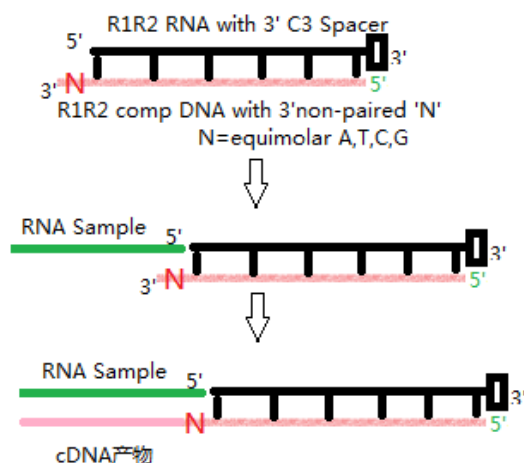
5×TGIRT Buffer	4 μl
100mM DTT	1 μl
10mM each dNTPs	2.5 μl
RNaseOUT-RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl
1μM DNA/RNA Duplex	1 μl (1 pmol)
TGIRT-III RTase (10 pmol/μl)	1 μl (10 pmol)
RNA	<1 pmol
Rnase Free H ₂ O Upto	20 μl

混合均匀后 50°C条件下反应 60min。

2.3 失活反应

向反应体系中加入 1μl 的 5M NaOH, 并于 95 度孵育 2min (过程时间的热变性可能会导致 cDNA 断裂损伤), 孵育完毕后立即加入 1μl 的 5M HCl 进行碱中和。

2.4 Template-Switching 原理图示



其它自备试剂:

- [1] dNTP Mixture (10 mM each) (货号: A0302);
- [2] RNaseOUT-RNase Inhibitor (40 U/μl) (货号: D1101);
- [3] 5M NaOH; [4] 5M HCl;
- [5] R1R2 comp DNA: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTG-TGCTCTTCCGATCTN-3';
- [6] R1R2 RNA: 5'-rArGrArUrCrGrArArGrArGrCrArCrArC-rGrUrCrUrGrArArCrUrCrArGrUrCrArC/-C3 Spacer/-3'