

**描述:** HaiGene ThermoStable V Reverse Transcriptase 反转录酶是在鼠源病毒反转录酶基础上进行定点突变改良而得。该酶去除了 RNase H 活性中, 从而避免反转录过程中降解 RNA。同时经过突变文库筛选, 使得其热稳定性更强(最佳活性温度 55°C), 该酶在 65°C 条件下仍然有部分活性。相比于低温条件下反转录反应, 采用高温反转录可显著打开 RNA 二级结构, 从而提高复杂 RNA 模板的扩增性能、提高反转录 cDNA 的长度和产量, 从而提高后续检测的灵敏度。

#### 组分

名称	10KU	50KU
ThermoStable V RTase-GFree (200U/μl)	50 μl	250 μl
10xRT Buffer	0.2 ml	1 ml

酶储存液: 10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 20%Trehalose, pH7.5。

**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:** 长期保存请置于-20°C 以下 (2 年有效); 制品反复冻融 10 次不影响性能, 但应避免反复冻融; 制品一经融化推荐置于 2-8°C 保存, 在此条件下制品稳定储存 1 个月。

#### 操作方法

1. 按以下组分配制反应体系

ThermoStable V RTase (200U/μl)	1 μl
10xRT Buffer	2 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Total RNA or Poly(A) RNA	0.1-2 μg
20xOligo dT(25)&Random Primer *	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.2 μl
RNase Free H <sub>2</sub> O	Up to 20 μl

\*注: Oligo dT(25) 使用浓度为 20~50 μM, 如使用 Random9 随机引物可使用 125 μM, 基因特异性引物可使用 5 μM。

2. 在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应

30°C	5 min
*37~65°C	15~30 min
85°C	5 min

\*推荐的反转录温度设置为 55°C, 无论是高 GC 或长片段模板, 均可获得综合性的 cDNA 产量。

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 55-60°C, RT 时间为 5min, 酶的参考用量为: 终反应浓度 0.5-2U/μl。