

产品说明

TGIRT-III RTnase 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 (TGIRT template-switching reaction, 用于 TGIRT-Seq)。TGIRT-III RTnase 具有极强的延伸性能，因此更易获得全长的 cDNA。此外，该酶的强 switch 活性，使得可以利用 RNA 的 5'端帽结构进行 SMART 建库 (SAMRT-Seq)。反应温度为 37-60°C，最佳反应温度为 50°C。

本公司 TGIRT-III Reverse Transcriptase 是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

1 活性单位指在 50°C 下，1×TGIRT-III Reverse Transcriptase 反应缓冲体系下，利用 poly(rA)/oligo(dT)₄₂ 作为底物，10 min 内将 10nmole dNTP 掺入酸不溶性物质所需的酶量。

活性测定条件

1×TGIRT Buffer1: 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.45 M NaCl, 5 mM MgCl₂。

1×TGIRT Buffer2: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT。

室温孵育 30min 后，加入 2.5 μl 的 10 mM dNTP 后，于 50°C 下反应 30min。

失活

反应结束后，向反应体系中加入 1μl 的 5N NaOH (终浓度 0.25N)，并置于 95°C 下加热 3min，失活该酶。失活后加入 1ul 的 5N HCl 中和 NaOH。

浓度: 10 pmole/μl

保存条件: 长期储存置于 -20°C 以下，可保存 2 年。

特点

- 比逆转录病毒逆转录酶更高的热稳定性，持续性和保真度，能够以高度结构化或修饰的 RNA 为模板，合成全长的端到端 cDNA。
- 新的端到端模板转换活性，其能够在逆转录过程中连接 RNA-seq 或 PCR 接头，并且不再需要单独的 RNA 3'-接头连接步骤。
- 不需要 RNA 连接酶，对模板量要求低，简化 RNA-seq 文库构建步骤，且更高效。

适用范围

- 确定 RNA 高级结构
- 长 cDNA 的合成
- 全基因组或靶向 RNA 结构分析
- 链特异性转录组分析
- 全细胞或无细胞转录组测序
- 非编码 RNA 转录组测序
- RIP-seq, HITS-CLIP, irCLIP and CRAC
- 通过高通量测序鉴定 RNA 碱基修饰

产品包装规格及组成

Component	AE0442A	AE0442B	AE0442C	AE0442D
TGIRT-III RTnase (10pmol/ul)	100ul	500ul	500ul×4	500ul×10
5×TGIRT Buffer 1	0.5ml	1.0ml×2	5.0ml×2	5.0ml×5
5×TGIRT Buffer 2	0.5ml	1.0ml×2	5.0ml×2	5.0ml×5
100mM DTT	0.25ml	1.2ml	1.0ml×4	1.0ml×10

质量控制

经过严格的质控检测，确保该产品具有最高的活性和纯度。

反应 Buffer

5×TGIRT Buffer1: 100mM Tris-HCl, pH7.5, 2.25M NaCl, 25mM MgCl₂。

5×TGIRT Buffer2: 100mM Tris-HCl, pH7.5, 50mM NaCl, 50mM MgCl₂, 5mM DTT。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 50% glycerol。

注意事项

- 本酶为热稳定性酶，简单高温加热不能完全失活酶。
- 若需要反应结束后失活酶，应加入终止反应液，然后再加热失活酶，需考虑终止液对后续实验的影响。
- 终止液包括终浓度：0.2M NaOH、100mM EDTA、1%SDS 等，若进行后续实验，建议终止液使用终浓度 0.25M NaOH 加热失活，并加入等量 HCl 中和 NaOH。

使用实例：

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积或浓度
5× Buffer	4ul
100mM DTT	2ul
底物：退火的 DNA 引物/RNA 模板*	Xul
酶(10p/μl)	1-2ul
H ₂ O	Yul
总体积	20ul

2) 室温孵育 30min

3) 加入 2.5 μl 的 10mM dNTP 后，于 50°C 条件下反应 10-60min (通常 15min)

4) 反应结束后，向反应体系中加入 1μl 的 5N NaOH，95°C 加热 3min，失活酶。失活后加入 5N HCl 中和碱。

5) 尿素变性 PAGE 电泳或琼脂糖电泳检测酶切产物，或按实验目的进行后续操作。

* RNA 加入量 1-100ng

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。