

PrimeScript™ II Reverse Transcriptase

Code No. 2690A Size: 10,000 U
Conc.: 200 U/μl

Supplied Reagent:
5X PrimeScript II Buffer 500 μl

Description :

PrimeScript II Reverse Transcriptase (RTase) yields high-quality cDNA with the least amount of background at standard reaction temperature (42°C) that doesn't cause RNA degradation because of its prominent primer use efficiency and addition of accessory protein, which resolves RNA secondary structure to inhibit cDNA synthesis and prevents RT-primer dependent mis-priming. The accessory protein completely inhibits non-specific extension reaction caused by reverse transcriptase on ice, thus the inhibition of long-strand cDNA synthesis doesn't occur even if it takes a while to start reverse transcription reaction after the reaction mixture was prepared. The synthesized cDNA can be used for many experiments such as 2nd-strand synthesis, hybridization, endpoint and quantitative PCR, and also this enzyme is particularly suitable for applications that require high-quality cDNA such as construction of full-length cDNA library and so on.

Storage buffer :

20 mM	Tris-HCl, pH 7.8
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
1%	Tween 20 (v/v)
50%	Glycerol (v/v)

Storage : -20°C

Source :

Purified from an *E. coli* strain expressing a recombinant enzyme.

Unit definition :

One unit is the amount of the enzyme that incorporates 1 nmol of [³H] dTTP in 10 minutes at 37°C, with poly (rA) · oligo (dT)₁₂₋₁₈ as the primer-template.

Reaction mixture for unit definition :

50 mM	Tris-HCl, pH 8.3
75 mM	KCl
8 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
20 μg/ml	(rA) _n · (dT) ₁₂₋₁₈
0.5 mM	[³ H] dTTP
0.1 %	NP-40

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

First-strand cDNA synthesis

- Preparation of cDNA probe
- RT-PCR

Composition of Supplied Reagent :

5X PrimeScript II Buffer (for cDNA synthesis)	
250 mM	Tris-HCl, pH 8.3
375 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

Standard protocol for 1st-strand cDNA synthesis :

1. Prepare the following mixture in a microtube.

Oligo dT primer	50 pmol
(or Random primer (6 mers)	50 pmol (20 - 100 pmol ^{*1}))
(or Gene specific primer	2 pmol)
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Template RNA	total RNA ≤ 5 μg ^{*2} , mRNA ≤ 1 μg
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

2. Heat at 65°C for 5 min and cool immediately on ice.

3. Prepare the reaction mixture by combining the following to a total volume of 20 μl.

Template RNA/Primer mixture	10 μl
5X PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 U
PrimeScript II RTase	200 U
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

4. Mix gently.

5. Perform the reaction under the following condition.

30°C	10 min (Only when Random 6 mers is used.)
42 (- 50)°C ^{*3}	30 - 60 min

6. Heat at 70°C for 15 min and cool on ice.

*1 For the use of random primer, use 20 - 50 pmol in case of cDNA synthesis for strand length more than 2 kb, on the other hand, use 50 - 100 pmol in case of cDNA synthesis for quantitative PCR.

*2 The amount of total RNA should be less than 1 μg in case of cDNA synthesis for quantitative PCR.

*3 PrimeScript II RTase shows powerful extension ability even if the template RNA has a strong secondary structure. Therefore, it is generally recommended to perform the RT reaction at 42°C with this enzyme. However, in case of RT-PCR, if the reverse primer for PCR is used as a RT primer, nonspecific products may be amplified due to mispriming. In such a case, it is recommended to perform the RT reaction at 45 - 50°C.

The obtained reactant can be used for 2nd-strand synthesis reaction or as a template for PCR.

PrimeScript is a trademark of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

PrimeScript™ II Reverse Transcriptase

Code No. 2690A 容量： 10,000 U
濃度： 200 U/μl

添付試薬：
5 × PrimeScript II Buffer 500 μl

●製品説明

PrimeScript II Reverse Transcriptase (RTase) は、卓越したプライマー利用効率と合成スピードを有する PrimeScript RTase と、cDNA 合成の妨げとなる RNA の高次構造を解消し、逆転写プライマーのミスプライミングを抑制するアクセサリタンパク質により、RNA 分解の恐れの小さい標準的な反応温度 (42°C) でバックグラウンドの少ない高品質な cDNA 合成を達成する。また、アクセサリタンパク質により、氷上における逆転写酵素の非特異的伸長反応が完全に抑制されているため、反応液調製後、逆転写反応するまでに時間を要しても長鎖の cDNA 合成の阻害は起こらない。合成された cDNA は 2nd-strand 合成、ハイブリダイゼーション、エンドポイント PCR やリアルタイム PCR に幅広く利用でき、特に完全長 cDNA ライブラリーの作製など、高品質な cDNA が必要なアプリケーションに適している。

●形状 20 mM Tris-HCl (pH7.8)
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
1% Tween 20 (v/v)
50% Glycerol (v/v)

●保存 - 20°C

●起源 組換え体大腸菌で発現、分離精製

●活性の定義

Poly (rA) · oligo (dT)₁₂₋₁₈ を鋳型/プライマーとして、37°C、10 分間に 1 nmol の [³H] dTTP を取り込む酵素活性を 1 U とする。

●活性測定用反応液組成

50 mM Tris-HCl (pH 8.3)
75 mM KCl
8 mM MgCl₂
10 mM DTT
20 μg/ml (rA)_n · (dT)₁₂₋₁₈
0.5 mM [³H]dTTP
0.1 % NP-40

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●用途

- 1st-strand cDNA 合成
- cDNA プローブ調製
- RT-PCR

●添付試薬組成 (保存：- 20°C)

5 × PrimeScript II Buffer (cDNA 合成用)
250 mM Tris-HCl (pH8.3)
375 mM KCl
15 mM MgCl₂

●標準プロトコール

< 1st-strand cDNA 合成反応 >

1. マイクロチューブ内で以下の液を混合する。

Oligo dT primer	50 pmol
(or Random primer (6 mers)	50 pmol (20 ~ 100 pmol*1))
(or Gene specific primer	2 pmol)
dNTP mixture (10 mM each)	1 μl
鋳型 RNA	total RNA : 5 μg 以下*2、mRNA : 1 μg 以下
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

2. 65°C で 5 分間保温した後、氷上で急冷する。

3. 以下の反応液を加え、全量を 20 μl にする。

上記鋳型 RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 U
PrimeScript II RTase	200 U
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

4. 軽く攪拌する。

5. 以下の条件で反応する。

30°C 10 min. (Random 6 mers 使用時のみ)
42 (~ 50) °C *3 30 ~ 60 min.

6. 70°C で 15 分間保温した後、氷上で冷却する。

* 1 : ランダムプライマーを用いて、2 kb 以上の鎖長の cDNA 合成を行う場合は 20 ~ 50 pmol、リアルタイム PCR 用の cDNA 合成を行う場合は 50 ~ 100 pmol を使用

* 2 : リアルタイム PCR 用の cDNA 合成を行う場合は、使用する total RNA 量を 1 μg 以下とする。

* 3 : PrimeScript II RTase は高次構造にも強い伸長性を示すので、通常の反応は 42°C を推奨する。RT-PCR において、PCR 下流プライマーを逆転写プライマーとして使用するとミスプライミングによる非特異的な増幅産物が生じる場合があるが、そのような場合には逆転写反応温度を 45 ~ 50°C にすることで改善が見られる。

得られた反応液は、PCR の鋳型として、あるいは 2nd-strand 合成反応に使用できる。

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v202011Da