

M-MLV 反转录酶

产品组成

Cat. No.	8006050	8006200
M-MLV 反转录酶	10000U	40000U
5×RT Buffer	0.5 ml	1 ml
RNase-free Water	1.5 ml	1.5 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃保存有效期为叁年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品为基因重组技术克隆表达的 RNase H 活性缺失型的莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus) 逆转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase)，在适当的引物存在条件下能以单链 RNA 或 DNA 为模板合成其互补 DNA 链。

野生型 M-MLV 逆转录酶含 RNase H 活性，可能降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。该突变型 M-MLV 逆转录酶中 RNase H 活性的缺失，能增强其合成长链 cDNA 的能力。

产品应用

1. cDNA 文库构建。
2. RT-PCR 反应及 Real Time RT-PCR 反应。
3. 引物延伸。
4. RNA 测序。

活性单位

产品浓度为 200 U/μl。活性单位定义：以 Poly (rA) 为模板，Oligo (dT) 为引物，在 37℃ 条件下，10 分钟内催化 1 nmol dTTP 掺入所需酶量定义为 1 个活性单位(U)。

纯度

以考马斯蓝染色 SDS-PAGE 检测纯度大于 90%，本品无核酸内切酶、外切酶及 RNase 污染。

用户需自备的试剂与物品

1. oligo(dT)₁₂₋₁₈ (10 μM) 或随机引物 (10 μM) 或 2 p mol 基因特异性引物。
2. dNTPs (10 mM each, Simgen Cat. No. 7701100)。
3. 可能需要 RNase Inhibitor (Simgen Cat. No. 8008125)。
4. RNase-free 的 1.5 ml 离心管。
5. 移液器及吸头 (为避免 RNA 酶的污染，必须选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头)。
6. 一次性手套、口罩等防护用品。
7. 恒温水浴锅。
8. 在无 RNA 酶使用的实验室操作，因唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在实验全过程中均穿戴乳胶手套和口罩。

操作步骤

1. 在无 RNase 的已灭菌微型离心管中加入以下试剂：

1) 2 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ (10 μ M) 或 2 μ l 随机引物 (10 μ M) 或 2 p mol 基因特异性引物；

2) 0.5-5 μ g Total RNA 或 50-500 ng mRNA；

* 少于 0.5 μ g Total RNA (比如病毒 RNA 的逆转录) 使用量时，应将 M-MLV 反转录酶的用量减少至 0.05-0.5 μ l，否则可能会导致后续 PCR 扩增产生非特异性扩增产物。

* 少于 0.5 μ g Total RNA 使用量时，建议再加入 1 μ l RNase Inhibitor (Simgen Cat. No. 8008125)。

* 如果 RNA 模板需要在 70℃加热 5 分钟以破坏二级结构的，也不应省略 RNase Inhibitor 的加入。

3) 2 μ l dNTPs (10 mM each)；

4) 补加 RNase-Free Water 至 15 μ l。

* 如果 RNA 模板 GC 含量丰富或者有复杂的二级结构，增加以下步骤：在 70℃加热 5 分钟以破坏 RNA 二级结构，再迅速置于冰上以阻止二级结构重新形成，然后短暂离心至管底。

2. 按下表加入试剂：

步骤 1 混合液	15 μ l
5 $\times$ RT Buffer	4 μ l
M-MLV 反转录酶	1 μ l *
Total	20 μ l

* 少于 1 μ g Total RNA 使用量时，应将 M-MLV 反转录酶的用量减少至 0.05-0.5 μ l。

3. 轻柔混匀，用随机引物作为引物时 25℃保温 10 分钟。

4. 42℃保温 60 分钟。

5. 95℃加热 5 分钟后冰上冷却或储存于 -20℃以下备用。

6. 用 RNase-free Water 稀释到 50 μ l，取 2-5 μ l 用于 PCR 扩增。