

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2438
产品名称:	重组 M-MuLV 反转录酶

产品简介:

本产品是利用基因工程技术,对 M-MuLV 反转录酶的基因进行定点突变改造后,通过原核重组表达、柱层析纯化得到的反转录酶,适用于常规反转录反应、RT-PCR 扩增、实时定量 RT-PCR 等实验的第一链 cDNA 合成。经过多重定点突变的 M-MuLV 反转录酶不仅去除了 RNase H 酶活性,而且增加了该酶与模板-底物的亲和力,合成的 cDNA 产量更多、更长(可以高效合成长达 13kb 的全长第一链 cDNA)。此外,该酶对于高温有更强的耐受性(在 50 °C 仍具有活性),可以使用较高的反转录反应温度,因此更好地克服了因模板 RNA 的二级结构而引起的反转录困难现象。

本产品适用合成 cDNA 第一链,用于 RT-PCR 和实时 RT-qPCR,用于克隆和表达研究。制备带标记的 cDNA 探针,用于 microarray 研究;DNA 标记和引物延伸法分析 RNA。

组分:

组分	组分名称	包装规格(10000U)
组分 A	M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) (200U/μl)	50 μl
组分 B	M-MuLV RT Buffer	500 μl

Buffer 成分: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25° C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT。

酶活定义: 活性单位的反转录酶定义为在 42 °C、10 分钟条件下,使 1nmol 的脱氧核糖核酸掺入酸性沉淀物质所需的酶量。

操作步骤:

一: 本步骤适于复杂模板或对扩增产量要求较高的实验。	
1: 在 DNase/RNase-free 离心管中依次加入下列成分。	
1:RNA 模板	≤8 μl (总 RNA 1-5 μg;poly(A) mRNA 0.1-0.5 μg)。
2:引物	1 μl(Oligo dT 引物/Random 引物 50 μM; 引物/序列特异性引物 50 μM)。
3:10 mM dNTP Mix	1 μl
4:DEPC-ddH ₂ O 补足至	14.5 μl
2: 混匀,短暂离心,65 °C 加热 5 分钟,打开 RNA 的二级结构。	
3: 立即置于冰上至少 1 分钟,避免 RNA 的二级结构重新形成。	
4: 向管中加入:	
M-MuLV RT Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
5: 轻轻混匀,短暂离心;如果采用 OligodT 或序列特异性引物,42 °C 温育 2 分钟;如果采用随机引物,25 °C 温育 2 分钟。	
6: 加入 1 μl M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-),轻轻混匀;如果采用随机引物,25 °C 温育 10 分钟。	
7: 42 °C 温浴 50 分钟。	
8: 85 °C 加热 5 分钟使酶失活。	
置于冰上进行后续实验或冷冻保存。	
二: 简化操作流程 (不适于复杂模板或对扩增产量要求较高的实验)	





1: 在 DNase/RNase-free 离心管中加入下列成分

1: M-MuLV RT Buffer	4 μ l
2: RNase Inhibitor	0.5 μ l
3: 10 mM dNTP Mix	1 μ l
4: RNA 模板	≤ 8 μ l (1-5 μ g 总 RNA 或 0.1-0.5 μ g poly(A) mRNA)
5: 引物	1 μ l (50 μ M Oligo dT 引物/ Random 引物/20 μ M 序列特异性引物)
6: M-MuLV Reverse Transcriptase	1 μ l
7: DEPC-ddH ₂ O	足至 20 μ l

2: 轻轻混匀, 短暂离心; 42 °C 温浴 50 分钟。

3: 85 °C 加热 5 分钟使酶失活; 马上置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

三: 选做步骤, 请根据实验情况选择。

1: RNase-free DNase I 处理 RNA 模板的方法

1: RNA	2-5 μ g
10 $\times$ DNase I buffer	1 μ l
DNase I (2 U/ μ l)	0.5 μ l
RNase Inhibitor	0.25 μ l
DEPC-ddH ₂ O	补足至 10 μ l

1: 混匀, 短暂离心, 37 °C 放置 30 分钟。

2: 加入 1 μ l 150mMEDTA, 65 °C 放置 15 分钟使 DNaseI 失活; 或者直接使用酚/氯仿抽提去除 DNaseI。

3: 为避免干扰反转录体系, RNA 加入量最好不超过反转录体系的 1/5, 如果 RNA 浓度过低, 建议沉淀浓缩后使用。

注意事项:

1: 实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2: RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用, 因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。
3: 由于所有的 RNA 提取方法都不能完全去除基因组 DNA, 所以应根据后续实验的需求, 选择是否需要在反转录反应前去去除残留基因组 DNA。
4: M-MuLVReverseTranscriptase 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA, 其起始位点由所用引物所决定: 随机引物 (RandomPrimer) 在 RNA 模板上没有特异性结合位点, 所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板; OligodTPrimer 只能以 poly (A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板; 采用序列特异性引物 (GSP) 以其结合位点为起始位点。
5: M-MuLVReverseTranscriptase 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增, 但加入体积不应超过 PCR 反应总体系的 10%, 否则影响目的片段的产量。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
6: 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板, 合成含各种标记的 cDNA, 作为杂交实验的探针。
7: RNA 应置于 -70 °C 以下保存, cDNA 合成产物应置于 -20 °C 保存。

储存: -20°C, 24 个月。

