



产品描述

本制品使用通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 THERMOscript H⁻ RTase。同时经过多点突变,提高了反转录温度耐受性,可以在 45-55°C 进行反转录(更高温度反转时活性会部分减低)。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H 活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA,因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。本酶 M-MuLV(RNase H⁻)的 RNase H 活性缺失,与 M-MuLV 相比,具有更强的延伸能力和稳定性,可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高,二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

产品应用

用于第一链 cDNA 合成。可用于低拷贝基因的检测。合成 cDNA 片段长度最高可达 12 kb。

产品组成

组份	PC112-01 5000U	PC112-02 10000U	PC112-03 50000U
M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (200U/μl)	25 μl	50 μl	
5×RT Buffer	250 μl	500 μl	PC111-02×3

产品储存

-20°C 保存。

单位定义

以 Poly (rA)-Oligo (dT) 为模板/引物,在 37°C,10 分钟条件下,掺入 1 nmol 的 dTTP 为酸不溶性物质所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测:200 U 的本酶和 0.6 μg λ -Hind III 在 37°C 下孵育 16 小时,DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测:200 U 的本酶和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 37°C 下孵育 4 小时,DNA 的电泳谱带不发生变化。

RNase 残留检测:200 U 的本酶和 1 μg 小鼠肝脏总 RNA 在 37°C 下孵育 1 小时,RNA 电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌 DNA 残留检测:200 U 本品中残留的核酸经 E.coli 16s rDNA 特异性的 TaqMan qPCR 检测,E.coli 基因组残留低于 10 拷贝。

功能检测 1:逆转录体系中加入 200 U 本酶,以 1 μg Hela cell total RNA 为模板,Oligo (dT)₁₈ 为引物,42°C 反应 45 分钟。取 1/10 cDNA 产物进行 PCR 扩增 DNCH 基因。琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,可见有单一的 3.2 kb 条带。



应用实例

在 RNase free 离心管中配制如下混合液

RNase free ddH ₂ O	to 20 μ l
5 × RT Buffer	4 μ l
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l
Oligo (dT) ₁₈ (50 μ M) or Random hexamers (50 ng/ μ l)	1 μ l
or Gene Specific Primers (2 μ M)RNase inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l
模板RNA	Total RNA: 100 pg-5 μ g Poly (A)+ RNA: 10 pg-500 ng

按下列条件进行第一链合成反应：

使用 Oligo (dT)₁₈

42 °C	45 min*
70 °C	15 min

使用 Random hexamers

25 °C	10 min
42 °C	45 min*
70 °C	15 min

使用 Gene Specific Primers

42-45 °C	45 min*
70 °C	15 min

*可在 30-60 min 间调整。延长逆转录时间可能有助于获得更长的 cDNA (>5 kb)。

70 °C 15 min 为逆转录酶灭活步骤。cDNA 产物可在 -20 °C 储存或立即用于 PCR 反应。用于 PCR 反应的 cDNA 产物体积建议不超过 PCR 反应体积的 1/10。

注意事项

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 如果 RNA 模板 GC 含量丰富或者有复杂二级结构, 可以先只加 RNA 模板、引物和和 RNase free H₂O 混匀, 65°C 变性 5 分钟, 冰上冷却, 短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
4. M-MLV (H-) Reverse Transcriptase 非常粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。