

M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H⁻)

产品套装编号: **C0201A**

产品内容	产品编号	包装规格
M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H ⁻)	C02010A	50 µl (200 U/µl)
5×RT Reaction Buffer	C02011A	250 µl
ddH ₂ O (DNase/RNase Free)	C10230A	1 ml

储存条件: -20℃ 保存

■ 产品概述:

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。

■ 来源:

大肠杆菌重组表达纯化。

■ 活性单位:

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 (品质检测):

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。

■ 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。

■ 实验流程 (First Strand cDNA合成):

1. 在无RNase的已灭菌微型离心管中加入1 µl引物和1 µg Total RNA或10 ng mRNA, 并加ddH₂O至13 µl。
2. 在70℃加热5分钟以破坏RNA二级结构。
3. 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。
4. 按下列顺序加入以下试剂至上述引物和模板的混合样品中:

5×RT Reaction Buffer	5 μl
dNTP混合物(各25 mM)	1 μl
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 μl
RNase Inhibitor (25 U/μl)	1 μl
加入ddH ₂ O (DNase/RNase Free) 至总体积	25 μl

5. 轻柔混匀，用随机引物作为引物时37℃保温60分钟，其他引物42℃保温60分钟。
6. 85℃加热5分钟后冰上冷却。所得的cDNA可直接用于2nd-Strand cDNA合成或者PCR扩增。

■ 储存条件:

150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.6), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP-40和50% 甘油, -20℃储存。

■ 使用注意事项（反应优化指南）:

1. Total RNA使用量一般为10 ng~5 μg, mRNA使用量一般为1 ng~100 ng。
2. 引物配制浓度可参考: Oligo (dT) 引物60 μM, 随机引物250 μM, 特异引物10 μM。

■ FAQ:

1. 缺失RNase H的M-MLV逆转录酶与其他逆转录酶相比有什么优点?

答: 从鸟类成髓细胞白血病病毒(Avian Myeloblastosis Virus)中纯化的AMV 逆转录酶和从*E. coli*中重组表达的莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney Murine Leukemia Virus)中纯化的M-MLV逆转录酶是两种最为常用的逆转录酶。AMV和M-MLV逆转录酶都有两种主要的活性: RNA依赖的DNA合成酶活性和RNase H活性, 其中RNase H是合成全长cDNA所不希望具有的。

一方面, RNase H会降解逆转录过程中形成的DNA/RNA杂交双链, 从而降低cDNA合成的产量, 增加RNA模板的最小用量。另一方面, 延伸过程中的RNA模板的降解也会导致cDNA合成的终止, 从而影响cDNA合成的长度。通常情况在RNase H活性存在的条件下, 合成大于5kb的全长cDNA是不合适的。而缺失RNase H的M-MLV逆转录酶是通过基因重组技术形成的突变体, 去除了RNase H活性的同时不影响RNA依赖的DNA合成酶活性。因此, 推荐在合成cDNA文库和全长cDNA时用去除RNase H活性的逆转录酶。

2. RT反应需要用mRNA吗, 是否可以用总RNA?

答: RT反应的RNA模板可以用总RNA或者mRNA。RT反应的成败主要取决于RNA的纯度, 与RNA类型无关。RNA整个提取过程中均需在无RNase的状态下进行。

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。



复能基因 FulenGen 地址:广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663
客服电话:020-32068595 电子信箱:support@fulengen.com 网址:www.fulengen.com